

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

**Perigraftreaktion von unbeschichteten Dacron- und antibakteriell
beschichteten Silber-Dacron-Gefäßprothesen. Eine quantitative Analyse am
tierexperimentellen Rückenhautkammermodell der Maus.**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

2014

vorgelegt von Nils Uwe Gola
geboren am 18.04.1983 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Zusammenfassung.....	4
Summary.....	6
2. Einleitung.....	8
3. Material und Methoden	16
3.1. Versuchstiere	16
3.2. Präparation der Rückenhautkammer.....	16
3.3. Implantierte alloplastische Gefäßprothesen.....	19
3.3.1. Dacron TM	19
3.3.2. Dacron Silver ^{+TM}	19
3.3.3. Dacron Silver ^{eTM}	19
3.4. Implantation des Gefäßprothesenfragments.....	21
3.5. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	23
3.5.1. Analyse der Mikrozirkulation.....	25
3.6. Histologie und Immunhistochemie.....	28
3.6.1. Konventionelle Histologie	28
3.6.2. Immunhistochemie: Caspase-3 und PCNA	29
3.7. Versuchsprotokoll.....	30
3.7.1. Versuchsgruppen	30
3.7.2. Versuchsablauf	30
3.7.3. Statistik	31
4. Ergebnisse.....	32
4.1. Vaskularisierung der Gefäßprothese	32
4.1.1. Dacron TM im Vergleich mit Dacron Silver ^{+TM}	32
4.1.2. Dacron Silver ^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver ^{eTM}	34
4.2. Mikrohämodynamik in der Umgebung der Gefäßprothese	35
4.2.1. Dacron TM im Vergleich mit Dacron Silver ^{+TM}	35
4.2.2. Dacron Silver ^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver ^{eTM}	36
4.3. Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Umgebung der Gefäßprothese	37

4.3.1.	Dacron TM im Vergleich mit Dacron Silver ^{+TM}	37
4.3.2.	Dacron Silver ^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver ^{eTM}	39
4.4.	Inkorporation der Implantate: Dacron TM und Dacron Silver ^{+TM}	41
4.5.	Kollagenbildung, Regeneration und Apoptose: Dacron TM im Vergleich mit Dacron Silver ^{+TM}	43
4.6.	Zellproliferation und Apoptose: Dacron Silver ^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver ^{eTM}	45
5.	Diskussion	47
5.1.	Dacron TM im Vergleich mit Dacron Silver ^{+TM}	47
5.2.	Dacron Silver ^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver ^{eTM}	51
6.	Literaturverzeichnis	54
7.	Danksagung/ Publikationen	61
7.1.	Danksagung	61
7.2.	Publikationen	62

Abkürzungsverzeichnis

ABI	Ankle-Brachial-Index
Ag	Argentum (lat. Silber)
AgNP	Silber Nanopartikel
CAE	Chloracetat-Esterase
Casp-3	Caspase-3
CKI	Chronisch Kritische Extremitätenischämie
GPI	Gefäßprotheseninfektion
HPF	High Power Field
IVM	Intravitalmikroskopie
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NO	Stickstoffmonoxid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PET	Polyethylenterephtelat
ppm	Teile pro Million
PTFE	Polytetrafluorethylen
RBC	Red Blood Cell
ROS	Reactive Oxygen Species
RHK	Rückenhautkammer
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

1. Zusammenfassung

Perigraftreaktion von unbeschichteten Dacron- und antibakteriell beschichteten Silber-Dacron-Gefäßprothesen. Eine quantitative Analyse am tierexperimentellen Rückenhautkammermodell der Maus.

Die Reduktion der Gefäßprotheseninfektionen ist eine der großen Herausforderungen in der Gefäßchirurgie. Die äußere Beschaffenheit und die Beschichtung der Oberfläche der Gefäßprothesen stellen in diesem Zusammenhang einen potentiellen präventiv wirksamen Ansatzpunkt dar um Gefäßprotheseninfektionen zu vermeiden. Die Inzidenz der Gefäßprotheseninfekte hängt dabei nicht direkt von der Oberflächenbeschichtung ab, sondern vielmehr von der adäquaten Integration der Implantate im Gewebe des Empfängers.

Aufgrund der Vielzahl an zur Verfügung stehenden synthetischen Gefäßprothesen mit verschiedenen Oberflächenbeschichtungen war es das Ziel dieser Studie zu untersuchen, wie sich eine Silberbeschichtung auf die Biokompatibilität, Vaskularisierung der Implantate und den Integrationsprozess als Ganzes im Gewebe auswirkt. In einem Folgeversuch wurden Silberbeschichtungen mit unterschiedlicher Silberabgabledynamik untersucht und miteinander verglichen. Als tierexperimentelles Modell wurde die Rückenhautkammer der Maus verwendet. Unbeschichtete Dacronprothesen und Dacronprothesen mit verschiedenen Silberbeschichtungen wurden in die Rückenhautkammer einer C57BL/6-Maus implantiert. Anschließend wurden Angiogenese und Entzündungsreaktion in der direkten Umgebung des Implantates über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen mittels repetitiver intravitale Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Nach Beendigung der In-vivo-Experimente wurden Angiogenese, Zellproliferation, Apoptose und periprothetische Kollagensynthese histologisch sowie immunhistochemisch analysiert.

Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikant erhöhte Kapillardichte am Implantationsrand der Dacronprothesen mit Silberazetatbeschichtung (Dacron Silver^{+TM}) verglichen mit unbeschichteten Dacronprothesen (DacronTM). Eine verstärkte leukozytäre Entzündungsreaktion im Empfängergewebe konnte nicht nachgewiesen werden. Auch in Bezug auf Kollagenformation, Apoptose und Proliferation im Implantatbereich zeigten sich keine Unterschiede zwischen DacronTM und Dacron Silver^{+TM}. Im Vergleich der silberbeschichteten Dacronprothesen war eine signifikant erhöhte Kapillardichte in der Umgebung des Implantats mit Silberazetatbeschichtung feststellbar. Die Entzündungsreaktion der Dacron Silver^{+TM} war verglichen mit der mit metallischem Silber vaporisierten Dacronprothese (Dacron Silver^{eTM}) weniger stark ausgeprägt, was durch eine signifikant verringerte Anzahl an wandständigen Leukozyten bestätigt wurde. Im

Granulationsgewebe der Dacron Silver⁺™ zeigte sich eine mäßig gesteigerte proliferative Aktivität. Die Anzahl apoptotischer Zellen war bei beiden Silberprothesen niedrig ohne auffällige Unterschiede. Hinsichtlich mikrozirkulatorischer Parameter wie Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit, volumetrischer Blutfluss und der Scherrate zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Wie die Ergebnisse der Experimente zeigen, verbessert die Silberazetatbeschichtung der Oberfläche die Vaskularisierung der Implantate ohne dabei eine nennenswerte Entzündungsreaktion im Gewebe des Empfängers hervorzurufen. Demzufolge kann eine modifizierte Prothesenbeschichtung mit Silberazetat eine verbesserte Inkorporation der Implantate im Gewebe bewirken. Die erhöhte funktionelle Kapillardichte der Dacron Silver⁺™ im Vergleich mit Dacron Silver^e™ deutet darauf hin, dass die Inkorporation von Gefäßprothesen mit Silberbeschichtung direkt mit der Fähigkeit der Silberabgabe in das Gewebe in Zusammenhang steht.

Summary

Perigraft reaction of uncoated and silver coated Dacron vascular prostheses. A quantitative analysis using the dorsal skinfold chamber of mice.

The reduction of prosthetic vascular graft infections remains to be a major challenge in vascular surgery. Texture, coating and various material modifications of prosthetic vascular grafts could be a promising approach to reduce the risk of prosthetic vascular graft infections. The incidence of PVGI does not only depend on the specific coatings on the grafts surface but also on a comprehensive integration of the implants into the surrounding host tissue. Numerous prosthetic vascular grafts with different coatings have been introduced into clinical practice. Therefore, it was the aim of this study to analyze how prosthetic vascular graft coatings such as silver influence the biocompatibility, vascularization and integration of the implants within the host tissue. In the following experiment we analyzed and compared prosthetic vascular graft coatings with different rates of silver release into the surrounding tissue.

As an experimental animal model we used the dorsal skinfold chamber of mice. Uncoated Dacron prosthetic vascular grafts and Dacron vascular grafts with different silver coatings were implanted into the dorsal skinfold chamber of C57BL/6 mice. Subsequently, angiogenesis and leukocytic inflammation at the implantation site was examined by means of repetitive intravital fluorescence microscopy over a 14 day period. At the end of the in-vivo-experiments angiogenesis, apoptosis, cell proliferation and collagen formation in the granulation tissue surrounding the implants was analyzed by histology and immunohistochemistry.

Our results show that silver acetate coated Dacron Silver⁺™ exhibits an improved vascularization as indicated by a significantly increased functional capillary density when compared to uncoated Dacron[™]. This was not associated with a stronger leukocytic inflammatory host tissue response. There was no difference between uncoated Dacron and Dacron Silver concerning collagen formation, apoptosis and cell proliferation within the granulation tissue. Analyzing the two different silver coatings silver acetate coated Dacron Silver⁺™ reveals a significantly increased functional capillary density in comparison to vaporized Dacron Silver^e™. The inflammatory response to Dacron Silver⁺™ was less pronounced, as indicated by a reduced number of adherent leukocytes. This was associated with a higher proliferative activity of the granulation tissue incorporating the Dacron Silver⁺™ implant. The number of apoptotic cells at the implantation site was low without marked

differences. In terms of microcirculatory values such as vessel diameter, RBC velocity, volumetric blood flow and wall shear rate there were no significant differences between the groups indicating comparable microhemodynamic conditions within the experimental groups.

The results of our study suggest that the silver acetate coating of the prosthetic vascular grafts surface improves the early vascularization of the implants without inducing severe inflammatory side effects within the host tissue. Accordingly, a modified prosthetic vascular coating with silver acetate contributes to an improved incorporation of the implants into the tissue. The increased functional capillary density of Dacron Silver⁺TM compared with Dacron Silver^eTM indicates that the incorporation of silver coated prosthetic vascular grafts correlates with the capability of silver release into the surrounding tissue.

2. Einleitung

Die Prävalenz der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) in Deutschland hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Mehrere groß angelegte Studien, in denen mittels ABI-Messung das Vorliegen einer pAVK diagnostiziert wurde, beweisen, dass die Prävalenz dieser Erkrankung mit zunehmendem Alter weiter ansteigt (Abbildung 2.1). In einem Alter zwischen 45 und 50 Jahren beträgt die Prävalenz etwa 2% (Kröger K et al., 2006). Gemäß der getABI-Studie leiden bereits 18% der über 65 Jährigen an einer manifesten pAVK (Diehm et al., 2004).

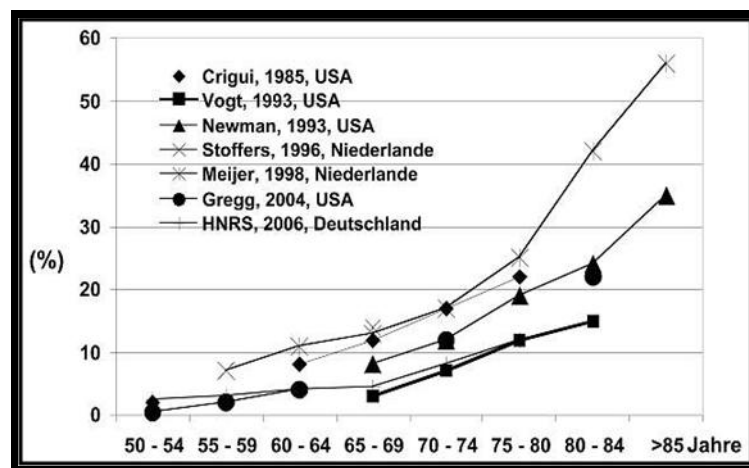


Abbildung 2.1: Prävalenzzunahme der pAVK in Prozent (%) in Abhängigkeit vom Lebensalter (Kroeger K, 2006).

Aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Gesamtbevölkerung sowie der Prävalenzzunahme von Atherosklerose und Diabetes in den westlichen Wohlfahrtsstaaten, muss davon ausgegangen werden, dass infolgedessen auch die Prävalenz der pAVK weiter ansteigen wird. Die pAVK ist bis heute eine unterdiagnostizierte Krankheit, so dass viele Menschen, die sich in einem asymptomatischen Stadium befinden, nicht wissen, dass sie an einer pAVK erkrankt sind (Bendermacher BL, 2007). Als Ausdruck dieser Entwicklungen belegen aktuelle Studien, dass es in den letzten Jahren zu einem signifikanten Anstieg der Hospitalisierungen von an pAVK leidenden Patienten gekommen ist. Des Weiteren zeigen die epidemiologischen Daten, dass insbesondere der Anteil der pAVK-Patienten

zugenommen hat, die bereits an einer chronischen Extremitätenischämie leiden (Malyar et al., 2013). Hier handelt es sich um ein bereits fortgeschrittenes Stadium der pAVK.

Diese Patientengruppe mit einer chronisch kritischen Extremitätenischämie ist eine Hochrisikogruppe mit hoher Mortalitäts- und Amputationsrate. Nach der Diagnose einer CKI müssen etwa 70% dieser Patienten entweder interventionell oder gefäßchirurgisch revaskularisiert werden (The Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland, 1995). Auch hier ist es in der jüngeren Vergangenheit zu einem deutlichen Anstieg sowohl der interventionellen Therapieverfahren, als auch der gefäßchirurgischen Eingriffe gekommen (Malyar et al., 2013). Der Gefäßersatz oder die Gefäßrekonstruktion sind häufig die letzten therapeutischen Optionen, um die pAVK in einem fortgeschrittenen Stadium zu behandeln. Der demographische Wandel und die epidemiologische Entwicklung der Atherosklerose haben zu einem vermehrten Gebrauch von Gefäßprothesen geführt (Hasse B et al., 2013; Nagpal A et Sohail MR, 2011).

In der rekonstruktiven Gefäßchirurgie stehen heute verschiedene Gefäßersatzmaterialien zur Verfügung. Grundsätzlich wird zwischen biologischen und synthetischen Ersatzmaterialien unterschieden. In der Untergruppe der biologischen Gefäßersatzmaterialien hat der autologe Gefäßersatz, insbesondere die autologe Vena saphena magna, eine große klinische Relevanz. Allogene und xenogene Gefäßersatzmaterialien spielen eher eine untergeordnete Rolle. Kryopräservierte allogene Prothesen sind nicht in jeder Klinik verfügbar und sind besonderen klinischen Konstellationen vorbehalten. Deshalb wird diese Prothesenart seltener eingesetzt (Vogt PR, 2011). In der Subgruppe der synthetischen Gefäßersatzmaterialien haben sich Polyethylenterephthalat (PET) und Polytetrafluorethylen (PTFE) als die wesentlichen alloplastischen Gefäßersatzmaterialien etabliert (Chlupác J et al., 2009). Bis heute werden autologe Venen bevorzugt eingesetzt, da diese im Vergleich zu alloplastischen Gefäßprothesen niedrigere Infektionsraten und bessere Offenheitsraten aufweisen (Swain et al., 2004). Jedoch steht nicht bei jedem Patienten eine den Anforderungen entsprechende Vene zur Verfügung. In solch einem Fall ist die alloplastische Gefäßprothese eine gute Alternative, um eine nicht mehr ausreichend durchblutete Extremität vor einer Amputation zu bewahren. Alloplastische Gefäßprothesen bringen gewisse Vorteile mit sich. Die Operationszeiten sind kürzer und das chirurgische Trauma ist deutlich kleiner, da die aufwendige Präparation einer geeigneten Vene nicht notwendig ist. Darüber hinaus stehen alloplastische Gefäßprothesen in unbegrenzter Menge zur Verfügung und können zudem mit spezifischen Eigenschaften ausgestattet werden, die dem autologen Gefäßersatz überlegen sind (Sayers RD et al., 1998; Klinkert P et al., 2004). Allerdings bringt die Verwendung alloplastischen Materials auch Nachteile mit sich. Ein wesentlicher und

entscheidender Nachteil ist das erhöhte Risiko für eine Gefäßprotheseninfektion (Biro G et al., 2011; Leroy O et al., 2012).

Die Gefäßprotheseninfektion (GPI) ist eine bekannte und gefürchtete Komplikation in der Gefäßchirurgie, die für den Patienten verheerende Folgen haben kann (Legout L et al., 2011). Die Infektionsrate liegt zwischen 0,5 und 6%. Die mit einem GPI einhergehende Morbidität und Mortalität ist ebenfalls hoch (Ricco JB et al., 2011).

Es existieren keine einheitliche Diagnosekriterien für eine GPI (FitzGerald SF et al., 2005). Eine bereits seit Jahrzehnten existierende Einteilung, die Szilagyi entwickelt hat, wird bis heute zur Klassifikation postoperativer Infektionen nach gefäßchirurgischen Eingriffen angewendet. Nach Szilagyi et al. werden postoperative Wundinfektionen nach rekonstruktiven Gefäßeingriffen in drei Schweregrade eingeteilt (Tabelle 2.1). Diese Einteilung bezieht sich auf die Eindringtiefe der Infektion. Bei Gefäßprotheseninfektionen ersten und zweiten Grades sind nur die Dermis beziehungsweise das Subkutangewebe von der Infektion betroffen, jedoch nicht das Implantat selbst. Infektionen Grad I und II nach Szilagyi sind meistens gutartig und können durch eine konservative Therapie beherrscht werden. Bei Grad III Infektionen ist die Gefäßprothese ebenfalls infiziert. Im Gegensatz zu den oberflächlichen Wundinfektionen sind Grad III Infektionen schwer zu behandeln (Szilagyi et al., 1972).

Schweregrad	Eindringtiefe der Infektion
Grad I	Die Infektion ist auf die Dermis begrenzt. Das Implantat ist nicht betroffen.
Grad II	Die Infektion erstreckt sich über die Dermis bis in das subkutane Fettgewebe. Das Implantat ist nicht betroffen.
Grad III	Das Implantat ist in die Infektion involviert.

Tabelle 2.1: Klinische Klassifikation nach Szilagyi (Szilagyi et al., 1972)

Neben der bereits erwähnten Einteilung nach Eindringtiefe der Infektion existieren weitere Einteilungsmöglichkeiten, um GPI zu klassifizieren. Eine dieser Möglichkeiten ist die Einteilung nach dem zeitlichen Auftreten eines GPI nach Implantation. Hier werden Früh- und Spätinfektion voneinander unterschieden. Eine Frühinfektion wird definiert als eine

Infektion, die innerhalb von vier Monaten nach Implantation einer Gefäßprothese auftritt. Eine Spätinfektion tritt erst nach Ablauf von vier Monaten nach der Implantation auf (Bandyk DF et al., 1994; FitzGerald SF et al., 2005). Frühinfektionen werden in der Regel bereits in den ersten beiden Monaten nach dem Eingriff beobachtet und sind im Vergleich zu Spätinfektion wesentlich häufiger (Calligaro KD et al., 1995). Die Einteilung, welche von der L'Association de Recherche en Chirurgie entwickelt wurde, ist die wohl umfassendste Klassifikation, denn sie berücksichtigt sowohl den Aspekt der Eindringtiefe der Infektion als auch das zeitliche Auftreten einer Infektion (Tabelle 2.2).

I° Grad	Infektion innerhalb der ersten drei Monate
Stadium 0	keine Infektion; normale Wundheilung
Stadium 1	Infektion unwahrscheinlich; Präsenz eines der folgenden Kriterien bei negativem Keimnachweis: Inflammation, Hämatom, Lymphozele, Hautnekrose
Stadium 2	Weichteilinfekt über einer wahrscheinlich nicht infizierte Prothese; Präsenz eines der folgenden Kriterien: Stadium 1 mit positiven Kulturen aus den Weichteilen, purulenter Erguss; ohne Vorhandensein eines der Kriterien des Stadiums 3
Stadium 3	Infizierte Prothese: Präsenz mindestens eines der folgenden Kriterien: purulentes Sekret im unmittelbaren Kontakt zur Prothese, positiver mikrobiologischer Befund aus dem periprothetischen Gewebe oder der Prothese (direkter Nachweis und/oder Kultur), histologische Zeichen einer Infektion im Bereich der Prothese oder des periprothetischen Gewebes (alterierte polymorphkernige Zellen)
II° Grad	Nach dem dritten Monat postoperativ ist eine Protheseninfektion durch die Kriterien des Stadiums 3 definiert

Tabelle 2.2: Klassifikation für Gefäßprotheseninfektionen der l'Association Universitaire de Recherche en Chirurgie (Knosalla C, 2000).

Die Unterscheidung zwischen Früh- und Spätinfektion steht in engem Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitserregern, die einen GPI verursachen können. 80% der Gefäßprotheseninfektionen werden durch grampositive Bakterien verursacht. Koagulase-

positive Staphylokokken, insbesondere auch MRSA, konnten bei Frühinfektionen (< 4 Monate) nachgewiesen werden. Bei Spätinfektionen fanden sich am häufigsten koagulase-negative Staphylokokken, insbesondere *Staphylococcus epidermidis* (Stone PA et al., 2008; Frei E et al., 2011). Des Weiteren können auch Pilzinfektionen Ursache für eine Spätinfektion sein, treten jedoch eher selten auf (Hicks RC et al., 1997).

Die Prävalenz multiresistenter Erreger, allen voran MRSA, ist in den letzten zehn Jahren immer weiter angestiegen. Eine MRSA-Infektion nach einem gefäßchirurgischen Eingriff ist mit hoher Mortalität und Morbidität verbunden und stellt ein immer größer werdendes Problem in der Gefäßchirurgie dar (Cosgrove SE, 2006). Die Verwendung von synthetischen Implantaten ist dabei ein zusätzlicher Risikofaktor (Murphy GJ et al., 2001). Generell kommt der Spezies der Staphylokokken bei der Infektion synthetischer Implantate eine besondere Bedeutung zu, da etwa zwei Drittel der Implantatinfektionen durch Staphylokokken verursacht werden (von Eiff C et al., 2006; Darouiche RO, 2004). Die besondere Virulenz der Staphylokokken bei Implantatinfektionen steht in engem Zusammenhang mit der Fähigkeit dieser Spezies auf synthetischen Implantaten einen sogenannten Biofilm auszubilden. Die Bakterien sind in der Lage im Rahmen einer passageren Bakteriämie oder durch eine intraoperative Kontamination am Implantat anzuhaften. Die Bakterien adhärieren irreversibel an der Implantatoberfläche und schließen sich zu kleinen Bakterienkolonien zusammen. Im Anschluss daran beginnt der Bakterienverbund mit der Produktion einer extrazellulären Polysaccharidmatrix (Costerton JW et al., 1999). Eingebunden in diesen schleimigen Film aus Proteinen und Polysacchariden gelingt es den Bakterien sich langsam zu vermehren. Der Biofilm verleiht den Bakterien eine besondere Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika und der körpereigenen Immunabwehr, was die Therapie von Protheseninfektionen noch zusätzlich erschwert (Stewart PS et Costerton JW, 2001; Frei E et al., 2011; Götz F, 2002)

Betrachtet man die Pathogenese einer Gefäßprotheseninfektion, so ist davon auszugehen, dass es entweder während der Operation oder in der frühen postoperativen Phase zu einer Kontamination der Gefäßprothese mit Bakterien kommt. In den häufigsten Fällen geschieht dies in Form einer intraoperativen Besiedlung durch direkten Kontakt des Implantats mit der Haut des Patienten (Hicks RC et al., 1997). Die Anwendung einer nicht ausgereiften Operationstechnik wurde auch als eine potentielle Infektionsursache beschrieben (Lorentzen et al., 1985).

Bis heute werden viele Ansätze verfolgt, um die Infektionsrate zu senken. Dazu zählen zum Beispiel die stetige Verbesserung steriler Operationstechniken und der routinemäßige Einsatz einer perioperativen Antibiotikaphylaxe (O'Brien T et Collin J, 1992). Trotz dieser

Maßnahmen sind in den letzten 25 Jahren die Infektionsraten zwischen 0,5 und 6% konstant hoch geblieben (Mussa FF et al., 2007; Edwards WH Jr et al., 1987). Es kommt erschwerend hinzu, dass Patienten mit einer pAVK häufig multimorbide sind. Diese für Gefäßerkrankungen typische Multimorbidität erschwert es zusätzlich aus den existierenden klinischen Studien Rückschlüsse in Bezug auf die Behandlung zu treffen (Lanzer P, 2003; Smith SM et al., 2012). Dies ist mit Sicherheit einer der Gründe, weshalb bis heute keine Einigkeit darüber besteht, wie man einen GPI optimal behandeln sollte (Saleem BR et al., 2010; Ducasse E et al., 2004).

Deshalb ist im Zusammenhang mit Implantat-assoziierten Infektionen die Primärprävention solcher Infektionen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (Gao H et al., 2010). Aus diesem Grund wird über verschiedene Materialmodifikationen diskutiert, die das Risiko einen GPI zu entwickeln reduzieren könnten. In der Vergangenheit sind hierbei große Anstrengungen unternommen worden eine antibakterielle Beschichtung zu entwickeln, die eine Besiedlung der Gefäßprothese mit Bakterien verhindert. Hierzu wurden zum Beispiel unterschiedliche Gefäßprothesen vor der Implantation in Antibiotika oder antiseptische Lösungen getränkt. Außerdem wurden verschiedenartige Varianten von Silberbeschichtungen für die Prothesenoberfläche entwickelt. Die Wirksamkeit dieser Maßnahmen ist derzeit noch unklar (Gao H et al., 2012). Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die antimikrobielle Beschichtung der Gefäßprothesenoberfläche mit Silber in diesem Kontext nach wie vor einen wichtigen Ansatzpunkt darstellt (Hardman S et al., 2004).

Über die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Silber und Silberionen existieren bereits fundierte wissenschaftliche Erkenntnisse aus dem Bereich der anorganischen Chemie (Jin X et al., 2010). Unter In-vitro-Bedingungen entwickelt Silber in seiner ionisierten Form bakterizide und bakteriostatische Wirkungen auf fast alle Bakterien (Hardman S et al., 2004). Silber entfaltet die antimikrobielle Wirksamkeit in einem oxidierten, ionisierten Zustand, in Form des positiv geladenen Kations Ag^+ (Kumar R et Munstedt H, 2005). Die untersuchten Gefäßprothesen, die mit Silberazetat oder metallischem Silber beschichtet sind, besitzen ebenfalls die Fähigkeit ionisiertes Silber in unterschiedlichem Ausmaß von der Oberfläche abzugeben.

Diese Silberionen reagieren mit Thiolgruppen in Proteinen. Die bakteriellen Proteine werden dadurch inaktiviert. Gordon et al. beschreibt zudem eine durch Silberionen hervorgerufene Inaktivierung der Atmungskette und Enzymen des Zitronensäurezyklus. Durch die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen kommt es als Folge zu einer Schädigung der DNS der Bakterien (Gordon et al., 2010). Ein weiterer Wirkmechanismus besteht darin, dass Silberionen bewirken, dass die DNS der Bakterien in der kondensierten Form vorliegen, so

dass eine Replikation nicht mehr möglich ist (Feng QL et al., 2000). Eine Vermehrung der Bakterien wird somit verhindert.

Aufgrund dieser antimikrobiellen Eigenschaften werden Oberflächen von Medizinprodukten mit Silber beschichtet. Trotz dieser nachweislich vorhandenen antimikrobiellen Aktivität des Silbers konnte die antimikrobielle Wirksamkeit von Silberbeschichtungen unter In-vivo-Bedingungen in verschiedenen klinischen Studien nicht einwandfrei bestätigt werden (Goëau-Brissonnière OA, 2002). Dennoch befinden sich seit Jahren verschiedene Modelle silberbeschichteter Gefäßprothesen von unterschiedlichen Herstellern in klinischer Anwendung, unter anderem die in unseren Experimenten verwendeten Dacron Silver^{+TM} und Dacron Silver^{eTM}.

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten antibakteriellen Eigenschaften des Silbers bleiben in Bezug auf die Auswirkungen des Silbers der Prothesenoberfläche auf das umliegende Gewebe noch viele Fragen offen. Es ist nicht bekannt, inwieweit das in die Umgebung abgegebene Silber die Entzündungsreaktion und die Vaskularisierung der Prothese im Empfängergewebe beeinflusst. Die Entzündungsreaktion und die Vaskularisierung sind hierbei von großem Interesse, da sie die entscheidenden Faktoren für eine Integration der Gefäßprothese im Empfängergewebe sind. Die frühe Vaskularisierung der Gefäßprothese ist eine wichtige Voraussetzung dafür, dass sich die Gefäßprothese suffizient in das Implantationsgebiet integrieren kann (Menger MD et al., 1992). Die frühe Ausbildung von Gefäßnetzwerken auf der Prothese und in ihrer unmittelbaren Umgebung ist zwingend erforderlich, damit sich neues Granulationsgewebe ausbilden kann. Dadurch wird das Risiko einer Infektion durch Kontamination möglicherweise reduziert. Die Bildung von neuen Gefäßen wird als wichtiger Baustein der Inkorporation angesehen, da die neuen Gefäße das Implantat mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (Bae H et al., 2012). Es wird angenommen, dass eine mäßig ausgeprägte Vaskularisierung und die damit einhergehende insuffiziente Inkorporation der Gefäßprothese im Gewebe die Entstehung eines Seroms in direkter Nachbarschaft des Implantats mit anschließender Gefäßprotheseninfektion begünstigt (Menger MD et al., 1992).

Deshalb war es das Ziel dieser Studie in der Frühphase nach Implantation die Biokompatibilität und Vaskularisierung einer nicht beschichteten und einer silberbeschichteten Gefäßprothese, DacronTM und Dacron Silver^{+TM}, miteinander zu vergleichen. Bis heute ist nicht untersucht, welche angiogenen und inflammatorischen Effekte die Silberbeschichtung im Gewebe des Empfängers auslösen. In einem weiteren Experiment wurde die Biokompatibilität von zwei unterschiedlichen Silberbeschichtungen mit verschiedenen Silberabgabeprofilen, Dacron Silver^{+TM} und Dacron Silver^{eTM}, miteinander

verglichen. Aufgrund des steigenden klinischen Bedarfs an Gefäßprothesen, dem wiederauflebenden wissenschaftlichen Interesse an Silber als antimikrobiellem Wirkstoff und der steigenden Anzahl an Silber enthaltenden Medizinprodukten, war es ein weiteres Ziel unserer Studie die Auswirkungen von Silber in Bezug auf das Integrationsverhalten der Gefäßprothesen zu untersuchen (Stobie N et al., 2008; Monteiro DR et al., 2009).

Das angewendete Modell der Rückenhautkammer der Maus, das mit einer intravitalen Fluoreszenzmikroskopie kombiniert wurde, ermöglichte es die Bildung von Blutgefäßen und die Entzündungsreaktion im Verlauf von zwei Wochen quantitativ zu analysieren.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Die Experimente wurden an C57BL/6-Mäusen (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Mäuse hatten ein Körpergewicht zwischen 24 und 26 g und waren zwischen 8 und 12 Wochen alt. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten. Sie hatten stets Zugang zu Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Die Mäuse wurden bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit sowie unter Einhaltung eines 12-Stunden Hell- und Dunkelzyklus in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes gehalten. Die Eingriffe und Behandlungen wurden gemäß dem in Deutschland geltenden § 10 des Tierschutzgesetzes und den aktuellen Tierschutzrichtlinien für Versuchstiere (NIH Guidelines for the Care and the Use of Laboratory Animals) durchgeführt. Die Experimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt.

3.2. Präparation der Rückenhautkammer

Zuerst wurde die Maus gewogen und anschließend wurde eine dem Körpergewicht der Maus entsprechende Analgosedierung durchgeführt. Hierbei wurde der Maus eine zuvor zubereitete Narkoselösung mit 75mg/kg Ketaminhydrochlorid (KetavetTM; Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und 25mg/kg Xylazinhydrochlorid (RompunTM; Bayer, Leverkusen, Deutschland) mit einer 26 G Injektionskanüle intraperitoneal injiziert. Nachdem die Wirkung der Narkose eingesetzt hatte, wurde mit der Enthaarung der Maus begonnen. Die Narkosetiefe wurde vor Beginn der Manipulation und auch während des gesamten Präparationsprozesses regelmäßig überprüft. Hierzu wurde mit einer feinen anatomischen Pinzette ein Schmerzreiz an einer der Hinterpfoten der Maus ausgelöst. Gegebenenfalls wurde bei nicht ausreichender Narkosetiefe 0,1 ml der Narkoselösung nachinjiziert.

Das Fell und die Haare mussten im Präparationsgebiet vollständig entfernt werden. Zuerst erfolgte eine Elektrorasur und anschließend eine chemische Depilation unter Zuhilfenahme einer Enthaarungscreme (asid[®]-med; Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland), um die restlichen Haare vollständig zu entfernen. Die Enthaarungscreme wurde nach einer 10 minütigen Einwirkzeit mit lauwarmem Wasser abgespült. Dabei war es wichtig darauf zu achten, dass die Ohren der Maus nicht mit Wasser in Kontakt kamen. Danach wurde eine feuchtigkeitsspendende Augensalbe (Bepanthen Augen- und NasensalbeTM; Bayer, Leverkusen, Deutschland) in die Augen der Maus appliziert, um einer Schädigung der Horn- und Bindehäute durch Austrocknung vorzubeugen.

Die depilierte Rückenhaut der Maus wurde vor Beginn der Präparation mit einer Alkohollösung (74,1% Ethanol, 10% 2-Propanolol) (Softasept®N™; Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Während der Präparation wurde die Maus auf einem Wärmekissen gebettet, um einer perioperativen Auskühlung des Tieres entgegenzuwirken.

Im ersten Präparationsschritt wurde die zuvor enthaarte elastische Rückenhaut der Maus entlang der dorsalen Medianlinie mittels Haltefäden senkrecht zum Rücken an einer Haltevorrichtung aufgespannt. Die Hauptgefäßstämme der Rückenhaut (Abbildung 3.1 B, Pfeile) wurden unter Durchleuchtung mit einer Kaltlichtquelle aufgesucht. Diese Gefäße dienten als Orientierungspunkte für die korrekte Positionierung der Haltefäden. Im Anschluss daran konnte die erste Komponente des Titangestells (Gesamtgewicht 3.2 g) an der Rückenhaut der Maus befestigt werden. Dies gelang, indem der Titanrahmen mit sechs Einzelknopfnähten an der aufgespannten Rückenhaut an der Umschlagsfalte fixiert wurde. Zusätzlich wurden zwei Stichinzisionen in der Rückenhaut vorgenommen und zwei Schrauben durch den entstandenen Inzisionsspalt hindurchgeführt. An diesen Schrauben konnte zu einem späteren Zeitpunkt die Gegenseite des Titangestells befestigt werden.

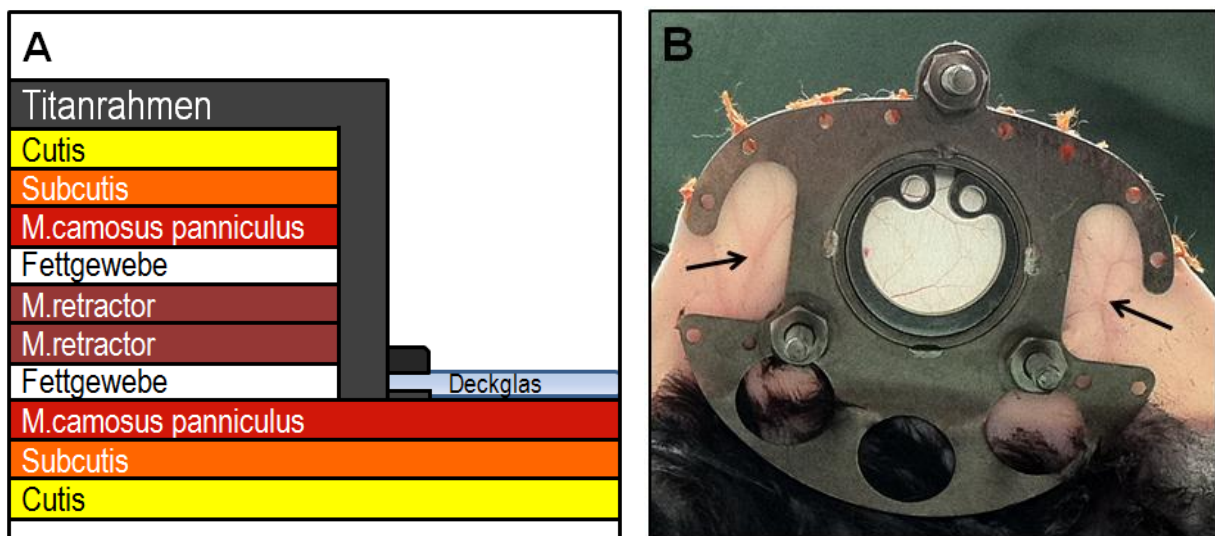


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Gewebeschichten einer Rückenhautkammer (A). Implantiertes Titangestell mit Sprengring und Deckglas. Außerdem sind die Hauptgefäßstämme (Pfeile) der Rückenhaut gut zu erkennen (B).

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Maus in Seitenlage unter einem Operationsmikroskop positioniert. Unter Verwendung eines mikrochirurgischen Operationsbestecks wurde der

obere Layer der Rückenhaut mit einem Durchmesser von 15 mm kreisrund komplett exzidiert. Die einzelnen Gewebeschichten wurden mit einer Mikroschere sorgfältig präpariert, bis die entsprechende Muskelschicht erreicht war (Abbildung 3.1 A).

Die Wunde wurde anschließend mit steriler Kochsalzlösung gespült. Danach wurde die zuvor bereits erwähnte zweite Komponente des Titanrahmens an Schrauben befestigt, die zuvor durch die oben beschriebenen Stichinzisionen entstandenen Öffnungen hindurchgeführt wurden. Zwischen den beiden Titanrahmen wurden zwei Stahlmuttern als Platzhalter installiert. Diese Platzhalter sollten verhindern, dass die versorgenden Blutgefäße zwischen den Titanrahmen zu stark komprimiert werden. Zuletzt wurden die nach der mikrochirurgischen Präparation verbleibenden Gewebeschichten (Epidermis, Subkutangewebe und dünne quergestreifte Muskulatur) erneut gespült und mit einem Deckgläschen sowie Sprengring luftdicht verschlossen (Abbildung 3.1 A und B).

Im Anschluss an die Präparation wurde die Maus in einen Einzelkäfig gelegt. Die Aufwachphase verbrachte die Maus unter einer Wärme spendenden Rotlichtlampe, die verhindern sollte, dass die Maus bei noch nachwirkender Narkose postoperativ auskühlt. Nach Abklingen der Narkose wurde die Maus zurück in die Versuchstierhaltung gebracht. Danach bekam die Maus 48 Stunden Zeit, um sich an das Titangestell zu gewöhnen und um sich von der Narkose und dem chirurgischen Trauma im Bereich des Rückenhautgewebes zu erholen. Bereits nach Ablauf der 48 Stunden zeigten die Tiere eine Gewöhnung an die Rückenhautkammer, was an normalem Ess- und Trinkverhalten sowie zunehmendem Bewegungsdrang zu erkennen war.

3.3. Implantierte alloplastische Gefäßprothesen

3.3.1. DacronTM

Bei dieser Gefäßprothese handelt es sich um ein gewirktes Polyestertransplantat, welches auf seiner Außenseite zusätzlich mit Kollagen beschichtet ist (Abbildung 3.2 A). Laut Hersteller soll eine sogenannte Flachprofil-Velours-Beschichtung auf der äußeren Prothesenoberfläche die Einheilung fördern (Maquet Holding B.V. & Co. KG, Rastatt, Deutschland).

3.3.2. Dacron Silver^{+TM}

Die Dacron Silver^{+TM} ist ebenfalls eine gewirkte kollagenbeschichtete Polyesterprothese. Die Gefäßprothese ist jedoch zusätzlich mit Silberazetat imprägniert, um dem Transplantat auch antimikrobielle Eigenschaften zu verleihen (Abbildung 3.2 B). Das Silber befindet sich sowohl in der Kollagenschicht als auch innerhalb der Prothesenstruktur (Ricco JB et al., 2006). Die Silberbeschichtung an der Oberfläche des Transplantats ermöglicht eine Abgabe von Silberionen an das Gewebe, nachdem sie implantiert wurde. Die Silberprothese besitzt ein spezielles Silberabgabeprofil, wonach innerhalb der ersten 24 Stunden nach Implantation besonders viele Silberionen in das Gewebe gelangen. Nach 24 Stunden erfolgt eine kontinuierliche Abgabe von Silberionen bis 30 Tage nach der Implantation (Ricco JB et al., 2006). Die Silberkonzentration auf der Oberfläche beträgt 0,06 bis 0,18 mg/cm² (Maquet Holding B.V. & Co. KG, Rastatt, Deutschland).

3.3.3. Dacron Silver^{eTM}

Auch bei dieser Prothese handelt es sich um eine gewirkte Polyesterprothese aus Polyethylenterephthalat. Diese Gefäßprothese wurde zusätzlich mit Polygelin, einer resorbierbaren modifizierten Gelatine bovinen Ursprungs imprägniert. Die antimikrobiellen Eigenschaften erhält das Transplantat durch eine Silberbeschichtung der äußeren Prothesenoberfläche (Abbildung 3.2 C). Diese Beschichtung gibt über einen Zeitraum von mehreren Jahren kontinuierlich kleine Mengen von Silberionen an die Umgebung ab. Wie in Abbildung 3.2 D veranschaulicht, verringert sich die Silberkonzentration auf der Oberfläche laut Herstellerangaben innerhalb eines Jahres um 2%. Auf der Oberfläche besitzt die Prothese eine Silberkonzentration von 0,07 bis 0,16 mg/cm² (Braun Melsungen AG, Vascular Systems, Berlin, Deutschland).

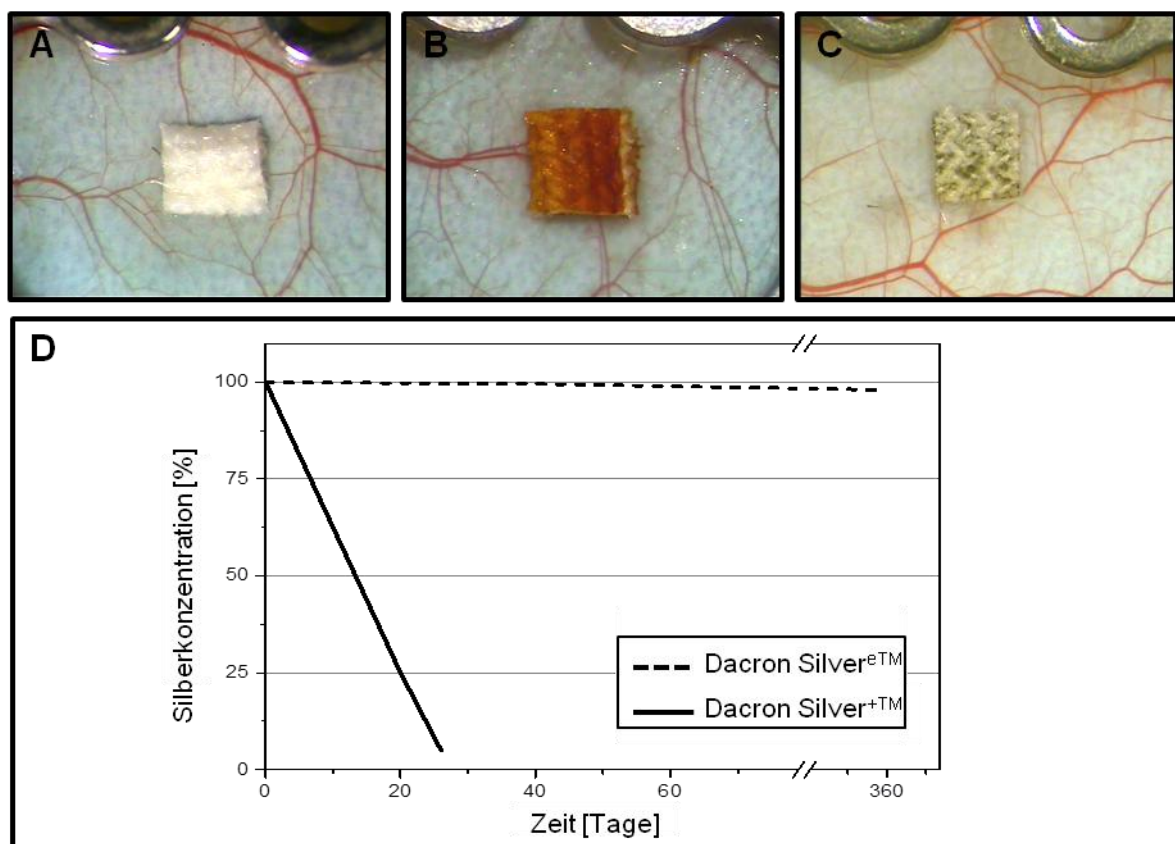


Abbildung 3.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Gefäßprothesentypen: DacronTM (A), Dacron Silver⁺TM (B) und Dacron Silver^eTM (C). Das Diagramm (D) veranschaulicht die unterschiedlichen Silberabgabeprofile der silberbeschichteten Gefäßprothesenoberflächen.

3.4. Implantation des Gefäßprothesenfragments

Die steril verpackte Rohrprothese wurde vor der Implantation in eine Größe und Form gebracht, die das Einsetzen in die Rückenhautkammer erlaubte. Hierzu wurden unter dem Operationsmikroskop in 10-facher Vergrößerung mit einem Skalpell 2 mm² große Gefäßprothesenfragmente zugeschnitten. Eine Schablone als Unterlage gewährleistete die maßgerechte Anfertigung der Prothesenfragmente.

48 Stunden nach Präparation der Rückenhautkammer wurde die Maus erneut mit 75mg/kg Ketaminhydrochlorid (KetavetTM; Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und 25mg/kg Xylazinhydrochlorid (RompunTM; Bayer, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert.

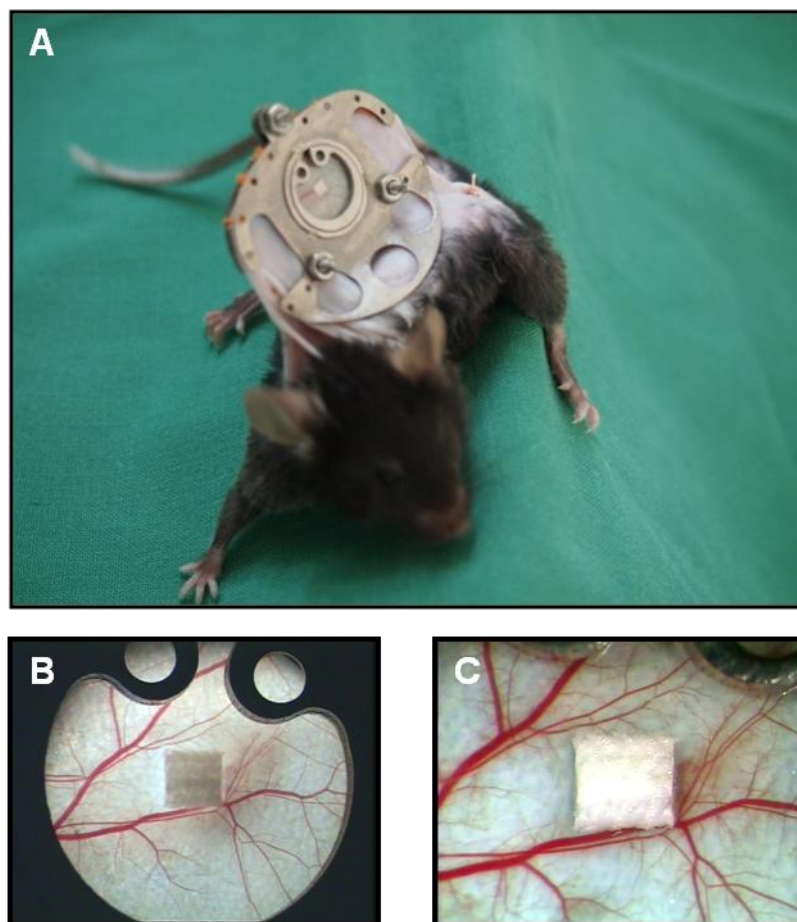


Abbildung 3.3: C57BL/6 Maus nach Präparation und Implantation des Gefäßprothesenfragments (A). Das Implantat wird zentral in die Rückenhautkammer eingebracht. Die äußere Oberfläche der Prothese kommt auf dem Muskelgewebe der Rückenhautkammer zum Liegen. Wie in Abbildung B und C zu erkennen, wird im Anschluss die Rückenhautkammer mit Deckglas und Sprengring ohne Lufteinschlüsse wieder verschlossen.

Die Maus wurde in horizontaler Lage auf einer Kunststoffplatte unter dem Operationsmikroskop positioniert. Der Sprengring und das Deckglas mussten vor Beginn der Implantation wieder entfernt werden. Nach Eröffnen der Rückenhautkammer wurde das vorbereitete Prothesenfragment mit der Prothesenaußenseite zentral auf das Muskelgewebe in der Rückenhautkammer platziert. Bei diesem Arbeitsschritt galt es das Risiko einer Kontamination oder der mechanischen Irritation des Gewebes auf ein Minimum zu reduzieren. Bei korrekter Lage des Implantats konnte die Rückenhautkammer umgehend wieder mit Deckglas und Sprengring verschlossen werden (Abbildung 3.3, A, B und C). Die Maus wurde im Anschluss an die Implantation der ersten intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zugeführt.

3.5. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Zur intravitale fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurde die narkotisierte Maus in Seitenlage auf einer Plexiglasplatte fixiert. Vor Beginn der Mikroskopie wurde der Maus 0,1 ml eines Gemischs aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen intravenös in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in einer 1-ml-Feindosierungsspritze im Verhältnis 1:1 gemischt. Der Fluoreszenzfarbstoff 5% Fluoreszein-Isothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran, Molekulargewicht 150.000 Da, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) bewirkt eine Kontrastverstärkung des Blutplasmas. So können die Intravasalräume dargestellt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) kann durch direkte Färbung Granulozyten und Monozyten sichtbar machen (Batz H et al., 1995). Die Färbung ermöglicht die Beurteilung der Leukozyteninteraktion mit dem Gefäßendothel.

Die Maus wurde mit einer Plexiglasbühne auf den Objekttisch eines modifizierten Zeiss Axiotech Mikroskops (Zeiss; Oberkochen, Deutschland) gelegt (Abbildung 3.4 B). Das Axiotech Mikroskop wurde zusätzlich mit einer 100 W HBO Quecksilberhöchstdrucklampe, einem Auflichtilluminator und einem Reflektorschieber modifiziert. Der Reflektorschieber enthielt drei unterschiedliche Filterblöcke, die eine Anregung mit blauem (450-490nm Anregungswellenlänge/ 520nm Emissionswellenlänge), grünem (530-560nm/580nm) und ultraviolettem Licht (330-390nm/430nm) ermöglichten.

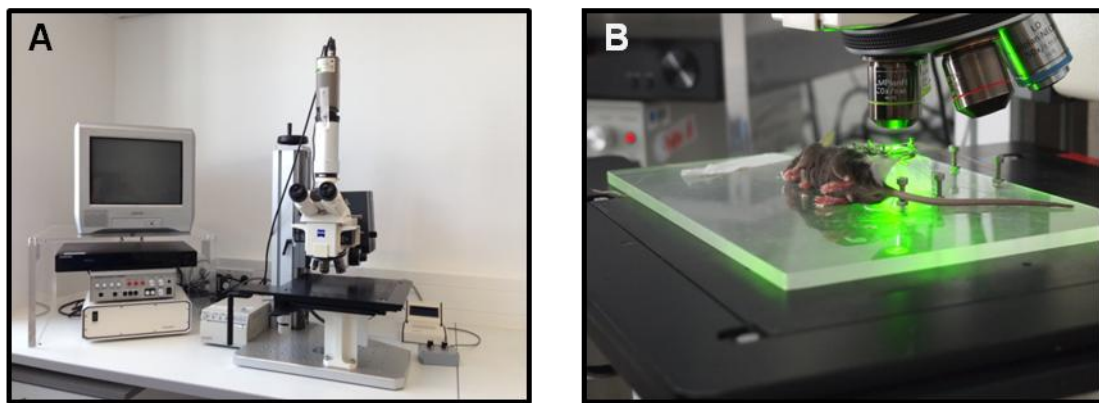


Abbildung 3.4: Intravitalmikroskop (A) und eine C57BL/6 Maus auf einer Plexiglasbühne während einer intravitalmikroskopischen Aufnahme in Grünlicht-Epi-Illumination (B).

Als weitere Module wurden ein Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Limited, Tokio, Japan) und eine CCD Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) an die Apparatur angeschlossen. Der Videotimer diente der Dokumentation der Versuchstiernummer und des Untersuchungstages im linken oberen Bildrand. Die während der Mikroskopie entstandenen Bilder wurden mit einem DVD-Recorder (DVD-R121; Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland) auf ein Speichermedium aufgezeichnet. Das gespeicherte Bildmaterial konnte dann zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet werden.

3.5.1. Analyse der Mikrozirkulation

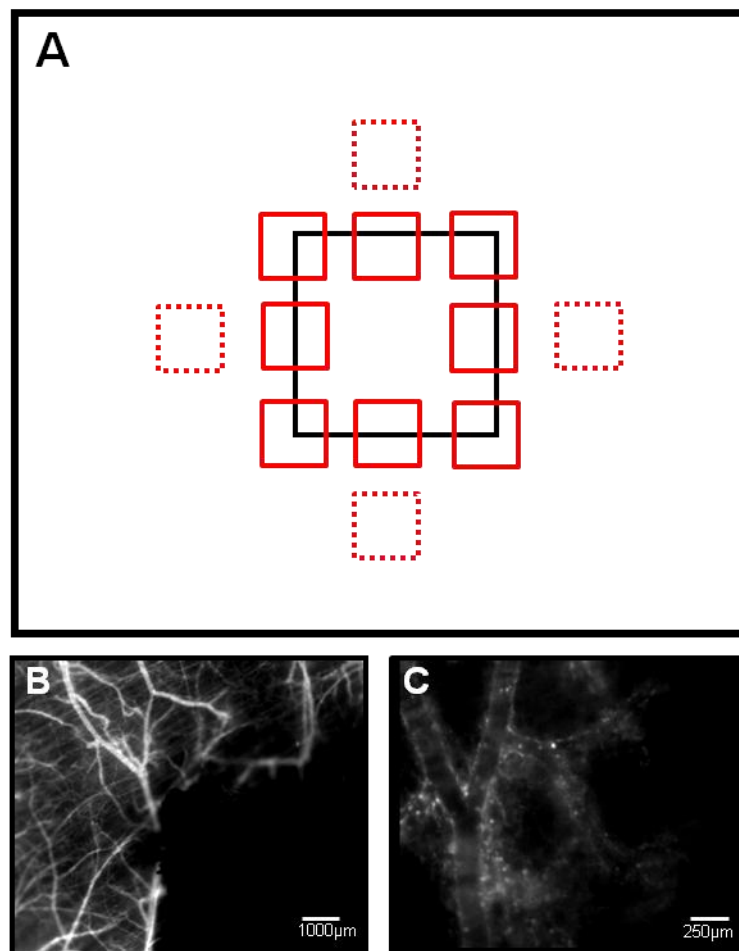


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der standardisierten intravitalmikroskopischen Untersuchung (A) mit den verschiedenen Analysearealen. Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurden 8 Analysefelder (A; rote Quadrate) im direkten Randbereich des Implantats aufgezeichnet. Leukozytenadhäsion und Mikrohämodynamik wurde an Venolen gemessen, die sich in unmittelbarer Umgebung des Implantats befanden (A; gepunktete Quadrate). Intravitalmikroskopische Aufnahmen in Blaulicht-Epi-Illumination (B) und Grünlicht-Epi-Illumination (C) zeigen beispielhaft ein Analysefeld im direkten Randbereich (B) und ein Analysefeld, das eine Venole in enger Nachbarschaft des Implantats zeigt (C). Zur Untersuchung der Mikrohämodynamik und der Leukozyten-Endothel-Interaktion wurden vier weitere „Regions of Interest“ (ROI) in enger Nachbarschaft zur Gefäßprothese selektiert (Abbildung 3.5 A und C). Innerhalb der Analysefelder befanden sich ausgewählte postkapilläre Venolen oder Sammelvenolen. An diesen Venolen wurden die mikrohämodynamischen Messungen durchgeführt. Die Analyse der Mikrohämodynamik erfolgte an den postkapillären Venolen. Diese wurden auch zur Beurteilung der Leukozyten-Endothel-Reaktion verwendet.

Die quantitative Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter wurde an dem in der Mikrozirkulationsforschung etablierten Bildanalyseprogramm Cap-Image (Zeintl, Heidelberg,

Deutschland) durchgeführt. Durch die Anwendung dieser Software konnten die Angiogenese, Leukozyten-Endothelinteraktion und Mikrohämodynamik im Verlauf quantitativ beurteilt werden.

Die Analyse der Neovaskularisierung erfolgte standardisiert an acht sogenannten „Regions of Interest“ (ROI), die sich im direkten Randbereich der Gefäßprothese befanden (Abbildung 3.5 A und B). Ein ROI hatte eine Fläche von 0,4 mm².

3.5.1.1. Funktionelle Kapillardichte

Neugebildete und durchflossene Kapillaren wurden in den acht ROI im Rahmen der Cap-Image Bildanalyse mit einer Computermouse nachgezeichnet. Die funktionelle Kapillardichte errechnete sich, indem die gemessene Gesamtlänge der neugebildeten bzw. nachgezeichneten Kapillaren durch die zu analysierende Fläche des Beobachtungsfeldes dividiert wurde (cm/cm²) (Menger MD et al., 1992).

3.5.1.2. Gefäßdurchmesser (d)

Der Gefäßdurchmesser der postkapillären Venolen wurde computerassistent gemessen. Dabei wurden am Computer zwei gegenüberliegende Randpunkte einer Venole festgelegt und miteinander verbunden. Die direkte Verbindungslinie der beiden Randpunkte stellte die Gefäßdurchmesserstrecke d dar. Die Gefäßdurchmesserstrecke d sollte rechtwinklig zum Gefäßverlauf ausgerichtet sein und wird in µm angegeben.

3.5.1.3. Blutzellgeschwindigkeit (v)

Zur Bestimmung der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten wurde die Line-Shift-Diagramm-Methode verwendet. Dabei wurde mit der Cap-Image-Software eine zur Flussrichtung parallel verlaufende Linie in die Mitte des Gefäßlumens der Venole gelegt. Danach wurde die auf DVD aufgezeichnete Mikroskopie für 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt. Während dieser Messperiode erstellte die Software zu verschiedenen Messzeitpunkten unterschiedliche Grauwertprofile, die in einem Bildspeicher abgelegt wurden. Das Computerprogramm erstellte auf der Grundlage dieser Grauwertprofile ein sogenanntes Line-Shift-Diagramm. Die Blutzellgeschwindigkeit v wurde dann aus dem Line-Shift-Diagramm abgelesen (Klyscz et al., 1997).

3.5.1.4. Mikrovaskulärer Blutfluss (Q)

Der Volumenfluss Q wurde mit folgender Formel berechnet:

$$Q = \pi \times (d/2)^2 \times v/1,6 \text{ [pl/s]}$$

d= Gefäßdurchmesser, 1,6(pl/s)= Baker-Wayland-Faktor

Innerhalb der Venolen mit einem Innendurchmesser zwischen 20 und 40 µm unterliegt die darin fließende Flüssigkeit einem parabolon Geschwindigkeitsprofil. Dies bedeutet, dass im Zentralstrom eine höhere Blutzellgeschwindigkeit als im Randbereich vorherrscht. Der Baker-Wayland-Faktor wurde in die Berechnung des Volumenflusses Q miteinbezogen, um die Diskrepanz zwischen gemessener Blutzellgeschwindigkeit im Zentralstrom und der durchschnittlichen Blutzellgeschwindigkeit auszugleichen (Baker M, Wayland L et al., 1974).

3.5.1.5. Scherrate (y)

Die Scherrate wurde auf der Grundlage der Newton'schen Definition mit folgender Formel berechnet:

$$y = 8 \times v/d$$

d= Gefäßdurchmesser, v= Blutzellgeschwindigkeit

3.5.1.6. Leukozyten-Endothel-Interaktion

Leukozyten wurden entsprechend ihrer Interaktion mit dem Gefäßendothel in frei fließende, rollende und wandständige Leukozyten eingeteilt (Rücker M et al., 2001). Wandständige Leukozyten wurden definiert als Leukozyten, die während eine Beobachtungszeit von 20 Sekunden sich nicht bewegten bzw. sich nicht vom Gefäßendothel lösen konnten. Die Anzahl der wandständigen Leukozyten wurde in Anzahl von Zellen pro Quadratmillimeter (mm²) Endotheloberfläche angegeben (Anzahl Zellen/mm²). Die Fläche des Endothels berechnete sich aus dem Gefäßdurchmesser und der Länge der analysierten Venole unter der Annahme, dass die ausgewählte Venole eine zylindrische Form besitzt. Rollende Leukozyten wurden definiert als Zellen, die sich innerhalb des Gefäßes mit einer Geschwindigkeit fortbewegen, die weniger als 2/5 der gemessenen Blutzellgeschwindigkeit v beträgt. Die Angabe erfolgte als Anzahl von Zellen, die innerhalb einer Minute einen Bezugspunkt in der Venole passieren (Anzahl Zellen/min; Menger MD et al., 1992).

3.6. Histologie und Immunhistochemie

Am Ende der Versuchsreihe wurde das Implantat sowie das umgebende Gewebe der Rückenhautkammer entnommen und in Formaldehyd 4% fixiert (Abbildung 3.6 A). Nach 24 Stunden wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und Serienschritte mit Schichtdicken von 3 μm angefertigt. Die Analyse der histologischen und immunhistochemischen Präparate erfolgte im Hellfeld und wurden an einem konventionellen Durchlichtmikroskop (BX 60; Olympus, Hamburg, Deutschland) in 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Die lichtmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte anhand des in Abbildung 3.6 B schematisch dargestellten Mikroskopieschemas.

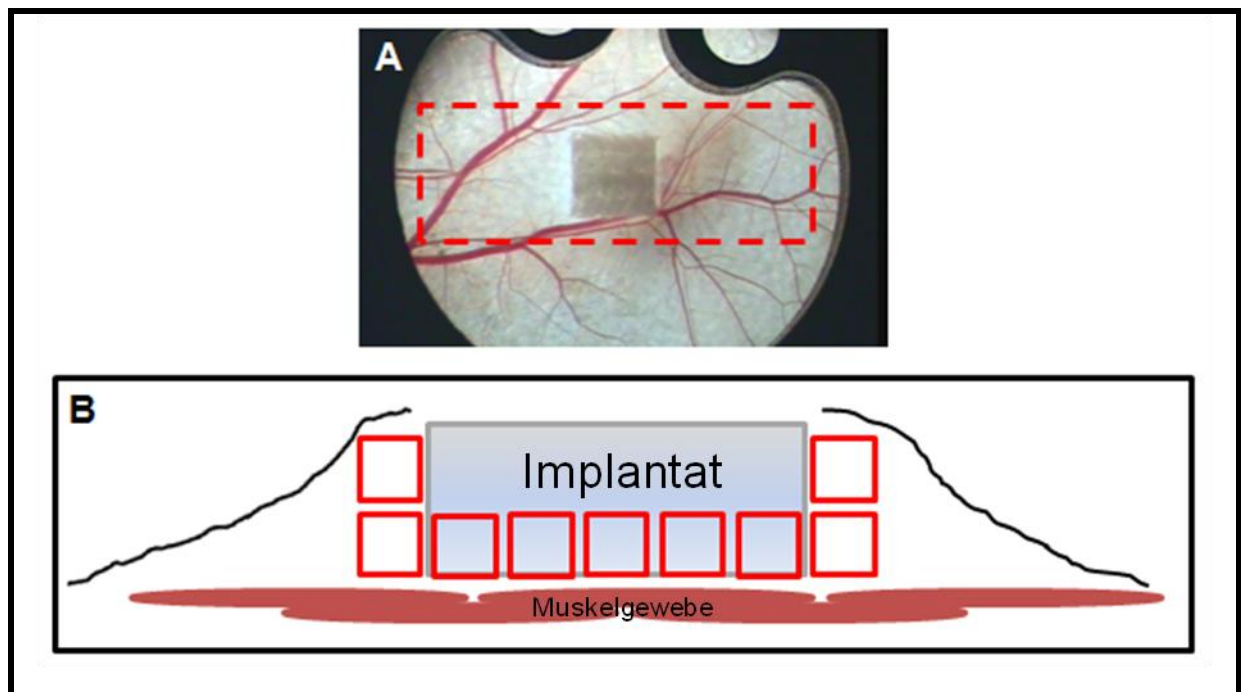


Abbildung 3.6: Das in (A) gekennzeichnete Areal (rotes Rechteck) der Rückenhautkammer wurde post mortem exzidiert. Nach histologischer Aufarbeitung wurde der Querschnitt entsprechend dem in (B) dargestellten Schema lichtmikroskopisch ausgewertet. Innerhalb des Gewebeschnitts wurden neun HPF's (rote Quadrate) auf der Prothese und deren unmittelbarer Nachbarschaft ausgewertet (B).

3.6.1. Konventionelle Histologie

Die Gewebeschnitte wurden zur ersten orientierenden lichtmikroskopischen Begutachtung mit Hämatoxylin und Eosin nach histologischem Standardprotokoll gefärbt. Hämatoxylin färbt saure Strukturen blau und Eosin basische Strukturen rot an.

Weitere Gewebeproben wurden mit einer Siriusrot-Färbung behandelt, um neuentstandene Kollagenfasern innerhalb des neugebildeten Granulationsgewebes zu identifizieren.

Des Weiteren wurde eine Chlor-Acetat-Esterase Färbung angefertigt. Bei der Chlor-Acetat-Esterase-Reaktion werden neutrophile Granulozyten rot angefärbt. Die Leukozyten, die sich rot anfärbten, wurden in fünf Gesichtsfeldern (HPF) im Implantatbereich ausgezählt.

3.6.2. Immunhistochemie: Caspase-3 und PCNA

Zur immunhistochemischen Analyse von apoptotischen Zellen im Gewebe der Rückenhautkammer wurde eine Caspase-3-Immunhistochemie durchgeführt. Zum spezifischen Nachweis einer Caspase-3 abhängigen Apoptose wurden die Gewebeschnitte mit einem polyklonalen Kaninchen anti-casp-3 Antikörper (1:100, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) als Primärantikörper inkubiert, der aktive cleaved Caspase-3 in der Maus erkennt. Ein mit Biotin konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper diente als Sekundärantikörper (abcam; Cambridge, UK), der an den Kaninchen Antikörper bindet.

Zur Identifikation von proliferierenden Zellen wurde ein monoklonaler Maus anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-Antikörper (1:100; Dako GmbH, Hamburg, Germany) als Primärantikörper verwendet. Ein Ziege anti-Maus Antikörper, der mit Streptavidin- oder Meerrettich-Peroxidase konjugierte wurde, wurde als Sekundärantikörper verwendet um die PCNA-positive Zellen sichtbar zu machen. Als Chromogen wurde 3,3' Diaminobenzidin benutzt.

Die Gewebeschnitte wurden nach Mayer mit Hemalaun gegengefärbt. Die Caspase-3 und PCNA-positiven Zellen wurden in 9 verschiedenen Analysefeldern (HPF) in 40-facher Vergrößerung beurteilt. Die Anzahl der positiven Zellen wurde als Prozent der absoluten Zellzahl eines HPF angegeben.

3.7. Versuchsprotokoll

3.7.1. Versuchsgruppen

Im Rahmen des Versuchs wurde an 24 C57BL/6-Mäusen (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) eine Rückenhautkammerpräparation durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere drei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet:

1. Gruppe DacronTM (n=8)
2. Gruppe Dacron Silver^{+TM} (n=8)
3. Gruppe Dacron Silver^{eTM} (n=8)

3.7.2. Versuchsablauf

Nach Ablauf von 48 Stunden nach Präparation der Rückenhautkammer erfolgte die Implantation eines Gefäßprothesenfragments in die Rückenhautkammer. Am Tag der Implantation (Tag 0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14 wurde eine intravitalmikroskopische Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Angiogenese, Leukozyten-Endothel-Interaktion und mikrohämodynamische Parameter wurden zu einem späteren Zeitpunkt computerassistent analysiert. Nach Beendigung der In-vivo-Experimente wurden die Tiere mit einer Überdosis eines Anästhetikums euthanasiert. Danach wurden das Implantat und das umliegende Gewebe vorsichtig exzidiert, um das Präparat für histologische und immunhistochemische Untersuchungen nutzen zu können (Abbildung 3.7).

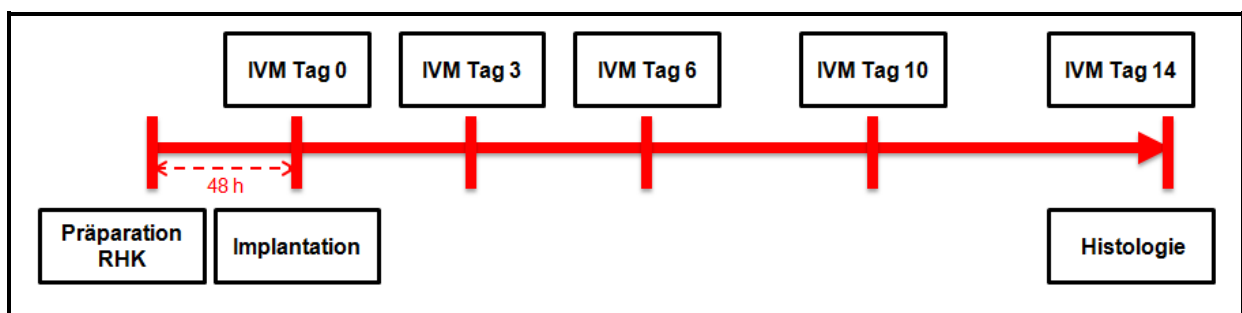


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs mit Zeitpunkt der Präparation, Implantation, der intravitalmikroskopischen Untersuchungen und der Gewinnung der histologischen Proben.

3.7.3. Statistik

Die gewonnenen Daten wurden auf Normalverteilung und Varianz überprüft. Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mit einem ungepaarten Student's t-Test untersucht (SigmaStat; Jandel Coporation, San Rafael, CA, USA). Eine statistische Signifikanz lag vor bei einem P-Wert $< 0,05$. Die Werte wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Vaskularisierung der Gefäßprothese

4.1.1. DacronTM im Vergleich mit Dacron Silver⁺TM

Sowohl die DacronTM- als auch Dacron Silver⁺TM-Implantate induzierten eine angiogene Gewebereaktion innerhalb der Rückenhautkammer des Empfängers. Die angiogene Gewebereaktion zeigte sich durch die Bildung von mikrovaskulären Sprouts. Die Sprouts, die von Venolen und Kapillaren in der direkten Grenzzone ausgingen, waren bereits drei Tage nach der Operation sichtbar. An den folgenden Untersuchungstagen wuchsen die Sprouts zunehmend weiter in die Umgebung des Implantats ein und bildeten Netzwerke aus neugebildeten Gefäßen (Abbildung 4.1 A und B).

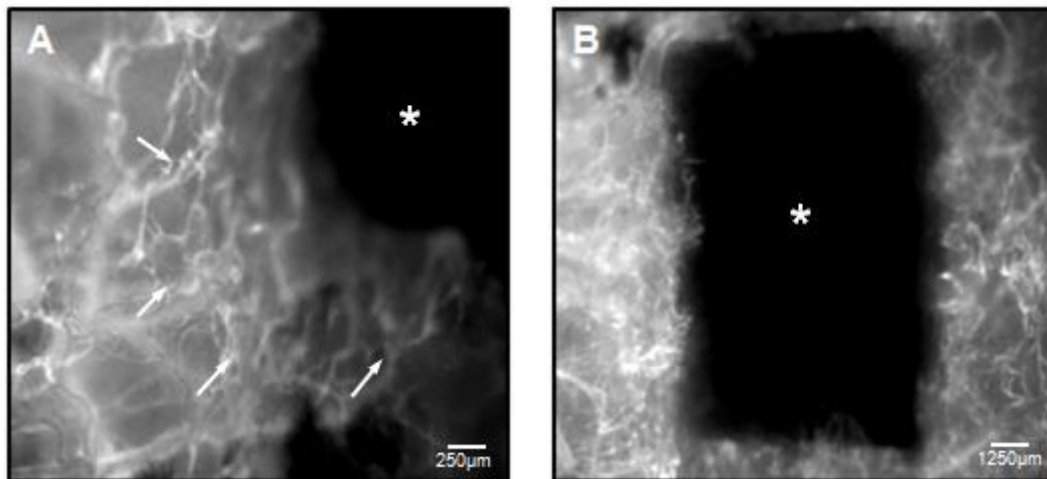


Abbildung 4.1: Intravitalmikroskopische Aufnahme der neugebildeten Gefäßnetzwerke (Pfeile) im Bereich eines intravitalmikroskopischen Analysefeldes (A). In der Übersichtsaufnahme (B) ist zu erkennen, dass es im gesamten Randbereich des Dacron Silver⁺TM-Implantats zu einer Neubildung von Gefäßnetzwerken gekommen ist.

Die Bildung mikrovaskulärer Netzwerke konzentrierte sich auf die direkte Prothesenumgebung. Im Zentrum der Implantate fand in keiner der Gruppen während des 14-tägigen Beobachtungszeitraumes eine Vaskularisierung der Prothese statt. Die Angiogenese und Vaskularisierung des Implantats waren in der Dacron Silver⁺TM-Gruppe stärker ausgeprägt (Abbildung 4.2 A und B). Dies zeigte sich an einer signifikant erhöhten funktionellen Kapillardichte in der Grenzzone des Prothesenfragments an den

Untersuchungstagen 3, 6, 10 und 14 verglichen mit der unbeschichteten DacronTM (Abbildung 4.2 C).

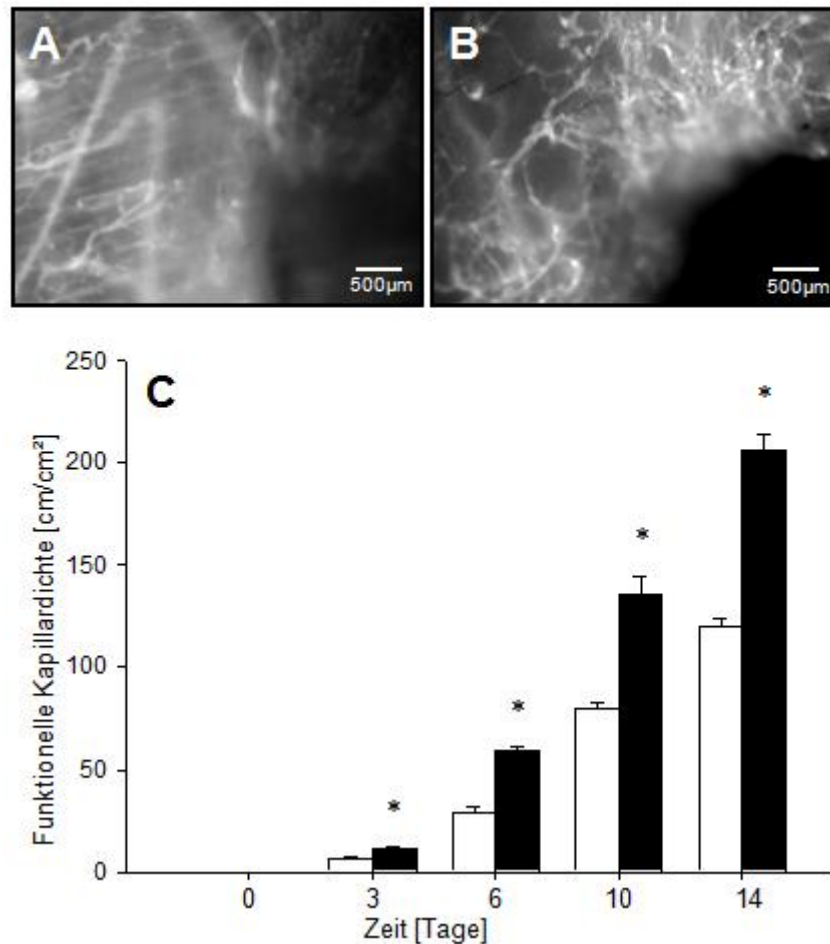


Abbildung 4.2: A und B zeigen intravitalmikroskopische Aufnahmen in Blaulicht-Epi-Illumination unter Kontrastverstärkung mit 5% FITC-markiertem Dextran. Auf den Bildern sind die Randbereiche eines unbeschichteten DacronTM-Implantats (A) und eines Dacron Silver⁺-Implantats (B) 14 Tage nach Implantation in die Rückenhautkammer einer C57BL/6 Maus zu erkennen. Die funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten im unmittelbaren Randbereich des DacronTM-Implantats (weißer Balken) und des Dacron Silver⁺-Implantats (schwarzer Balken), die mittels Intravitalmikroskopie und computergestützter Bildanalyse bestimmt wurde, kommt in diesem Balkendiagramm (C) zur Darstellung. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Kapillardichte in der Dacron Silver⁺-Gruppe an den Untersuchungstagen 3, 6, 10 und 14 im Vergleich zu DacronTM (C). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. *P<0,05 vs. DacronTM-Implantate.

4.1.2. Dacron Silver^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver^{eTM}

Die beiden Prothesenimplantate, Dacron Silver^{+TM} und Dacron Silver^{eTM} mit unterschiedlichen Silberbeschichtungen, induzierten ebenfalls eine angiogene Gewebereaktion in der Rückenhautkammer am dritten Tag nach der Implantation.

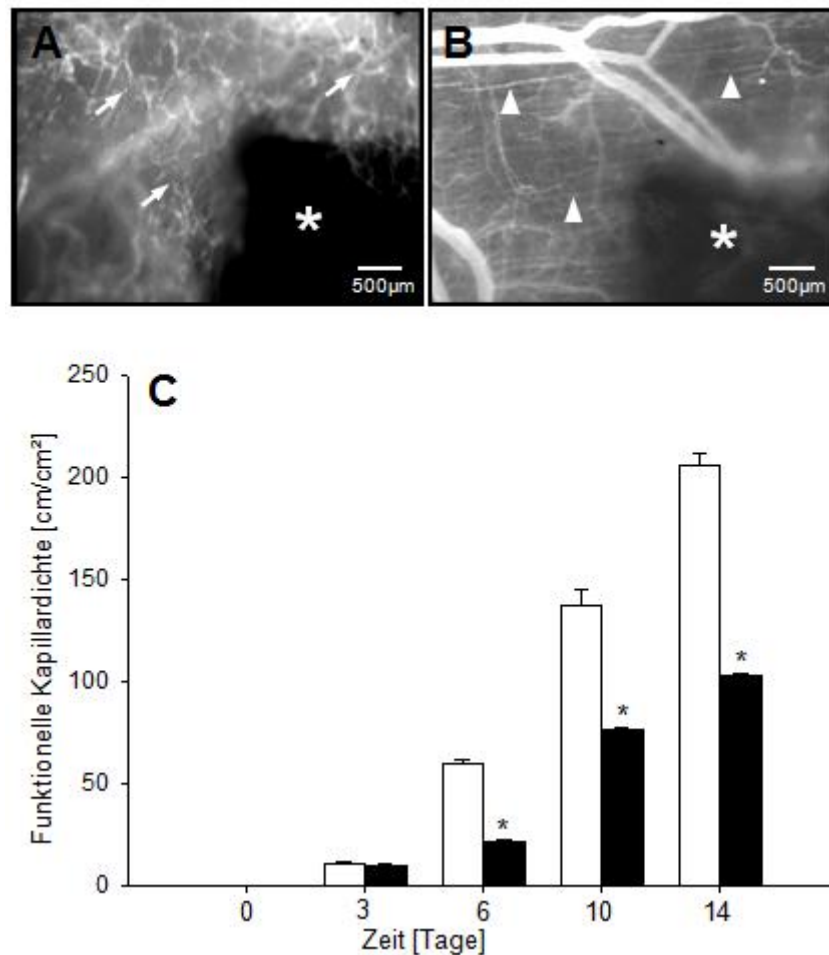


Abbildung 4.3: A und B zeigen intravitalmikroskopische Aufnahmen in Blaulicht-Epi-Illumination unter Kontrastverstärkung mit 5% FITC-markiertem Dextran im Randbereich der Gefäßprothesenimplantate der Versuchsgruppen Dacron Silver^{+TM} (A) und Dacron Silver^{eTM} (B) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Man beachte die hohe Dichte der neugebildeten Mikrogefäße im Randbereich des Dacron Silver^{+TM}-Implantats (A), die die Kapillaren des quergestreiften Muskelgewebes der Rückenhautkammer überwuchern (A, weiße Pfeile). Im Grenzbereich des Dacron Silver^{eTM}-Implantats sieht man vergleichsweise wenige neue Mikrogefäße ohne dass die ortsständigen vaskulären Strukturen überwachsen werden (B). Die parallel angeordneten autochthonen Kapillaren des Muskelgewebes sind jedoch deutlich sichtbar (B, weiße Dreiecke). Das Balkendiagramm zeigt die mittels Intravitalmikroskopie und computergestützter Bildanalyse ermittelte funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) im Randbereich der Dacron Silver^{+TM} (C, weiße Balken) und Dacron Silver^{eTM} (C, schwarze Balken) an den Untersuchungstagen 0, 3, 6, 10 und 14. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. *P < 0,05 vs. Dacron Silver^{+TM}.

Im Vergleich der beiden Silberprothesen zeigte sich eine verstärkte Angiogenese und Vaskularisierung im Implantatbett der DacronSilver^{+TM}-Gruppe. Die funktionelle Kapillardichte in der Dacron Silver^{+TM}-Gruppe war im Vergleich zu DacronSilver^{eTM} signifikant erhöht (Abbildung 4.3 C).

4.2. Mikrohämodynamik in der Umgebung der Gefäßprothese

4.2.1. DacronTM im Vergleich mit Dacron Silver^{+TM}

Die analysierten Venolen der DacronTM- und Dacron Silver^{+TM}-Gruppe, welche sich in unmittelbarer Nähe der Gefäßprothesenimplantate befanden, hatten einen Gefäßdurchmesser zwischen 24 und 28 μm (Tab.1). Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten (v) in diesen Venolen innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraumes betrug 150 bis 320 $\mu\text{m/s}$. Die daraus errechneten Werte für volumetrischen Blutfluss und die Scherrate betrugen 59-120 pL/s beziehungsweise 51-104 s^{-1} . Innerhalb der DacronTM- und Dacron Silver^{+TM}-Gruppe konnten in Bezug auf die Mikrohämodynamik keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser (μm)					
Dacron TM	26,2 \pm 1,0	24,8 \pm 1,6	24,0 \pm 1,1	25,6 \pm 1,1	24,5 \pm 1,1
Dacron Silver ^{+TM}	27,0 \pm 1,5	28,3 \pm 2,5	25,8 \pm 1,9	26,6 \pm 1,8	26,0 \pm 1,8
Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)					
Dacron TM	165,7 \pm 20,8	299,9 \pm 22,2	308,4 \pm 28,9	283,4 \pm 32,3	225,1 \pm 43,7
Dacron Silver ^{+TM}	150,1 \pm 26,8	250,7 \pm 9,6	283,9 \pm 17,9	321,2 \pm 22,9	311,8 \pm 20,0
Mikrovaskulärer Blutfluss (pL/s)					
Dacron TM	58,8 \pm 11,4	92,0 \pm 13,0	91,1 \pm 18,0	94,9 \pm 19,3	67,6 \pm 18,3
Dacron Silver ^{+TM}	62,1 \pm 17,3	103,3 \pm 16,5	97,6 \pm 14,9	120,2 \pm 21,9	103,5 \pm 19,9
Scherrate (s^{-1})					
Dacron TM	50,5 \pm 5,3	98,8 \pm 8,0	103,6 \pm 7,3	88,5 \pm 7,6	74,2 \pm 12,9
Dacron Silver ^{+TM}	51,9 \pm 10,7	75,6 \pm 8,3	86,6 \pm 9,0	98,1 \pm 7,4	94,9 \pm 6,9

Tabelle 4.1: Die Tabelle zeigt Gefäßdurchmesser (μm), Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$), volumetrischer Blutfluss (pL/s) und Wandscherrate (s^{-1}) in den ausgewählten postkapillären Venolen und Sammelvenolen im Grenzbereich der Gefäßprothesenimplantate DacronTM (n=8) und Dacron Silver^{+TM} (n=8) an den Untersuchungstagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Daten werden angegeben als Mittelwerte \pm SEM.

Dies deutete darauf hin, dass innerhalb der Versuchsgruppen vergleichbare mikrohämodynamische Bedingungen herrschten. Dies war die Grundlage für die weitere Analyse der Leukozyten-Endothel-Interaktion, die wir als charakteristische Eigenschaft für die Entzündungsreaktion des Empfängerorgans auf die Implantate interpretierten.

4.2.2. Dacron Silver^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver^{eTM}

Die mikrohämodynamischen Parameter in den Gruppen Dacron Silver^{+TM} und Dacron Silver^{eTM} zeigten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden Versuchsgruppen in Bezug auf Gefäßdurchmesser (23-30 μm) Blutzellgeschwindigkeit (109-323 $\mu\text{m/s}$), volumetrischem Blutfluss (32-115 pL/s) und Wandscherrate (26-111 s^{-1}).

	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser (μm)					
Dacron Silver ^{+TM}	28,1 \pm 1,4	30,1 \pm 2,0	27,2 \pm 1,5	27,8 \pm 1,6	24,5 \pm 1,1
Dacron Silver ^{eTM}	24,4 \pm 0,7	23,1 \pm 0,5	23,3 \pm 1,1	23,2 \pm 1,2	25,4 \pm 1,0
Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)					
Dacron Silver ^{+TM}	174,1 \pm 15,4	259,4 \pm 5,2	272,0 \pm 15,9	336,6 \pm 20,1	323,5 \pm 19,9
Dacron Silver ^{eTM}	108,6 \pm 10,5	233,5 \pm 16,8	262,9 \pm 16,1	312,8 \pm 19,6	315,3 \pm 30,3
Mikrovaskulärer Blutfluss (pL/s)					
Dacron Silver ^{+TM}	71,6 \pm 18,7	115,2 \pm 14,0	85,9 \pm 10,9	103,6 \pm 17,0	84,5 \pm 6,8
Dacron Silver ^{eTM}	32,4 \pm 3,1	63,1 \pm 4,8	76,1 \pm 11,8	85,8 \pm 9,8	113,7 \pm 6,1
Scherrate (s^{-1})					
Dacron Silver ^{+TM}	61,3 \pm 6,8	81,0 \pm 7,7	79,8 \pm 7,1	94,0 \pm 7,3	89,0 \pm 4,9
Dacron Silver ^{eTM}	36,4 \pm 4,5	81,9 \pm 6,3	91,2 \pm 4,6	110,8 \pm 10,4	98,1 \pm 11,4

Tabelle 4.2: Die Tabelle zeigt wie zuvor bei Tabelle 4.1. bereits erwähnt die mikrohämodynamischen Parameter in ausgewählten Venolen und im Grenzbereich der Gefäßprothesenimplantate Dacron Silver^{+TM} (n=8) und Dacron Silver^{eTM} (n=8) an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Daten werden angegeben als Mittelwerte \pm SEM.

Auch innerhalb dieser beiden Versuchsgruppen konnte auf der Grundlage vergleichbarer Mikrohämodynamik in den Venolen die Leukozyten-Endothel-Reaktion analysiert werden, um eine Aussage über eine inflammatorische Reaktion auf das Implantat im Gewebe der Rückenhautkammer nachweisen zu können.

4.3. Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Umgebung der Gefäßprothese

4.3.1. Dacron™ im Vergleich mit Dacron Silver⁺™

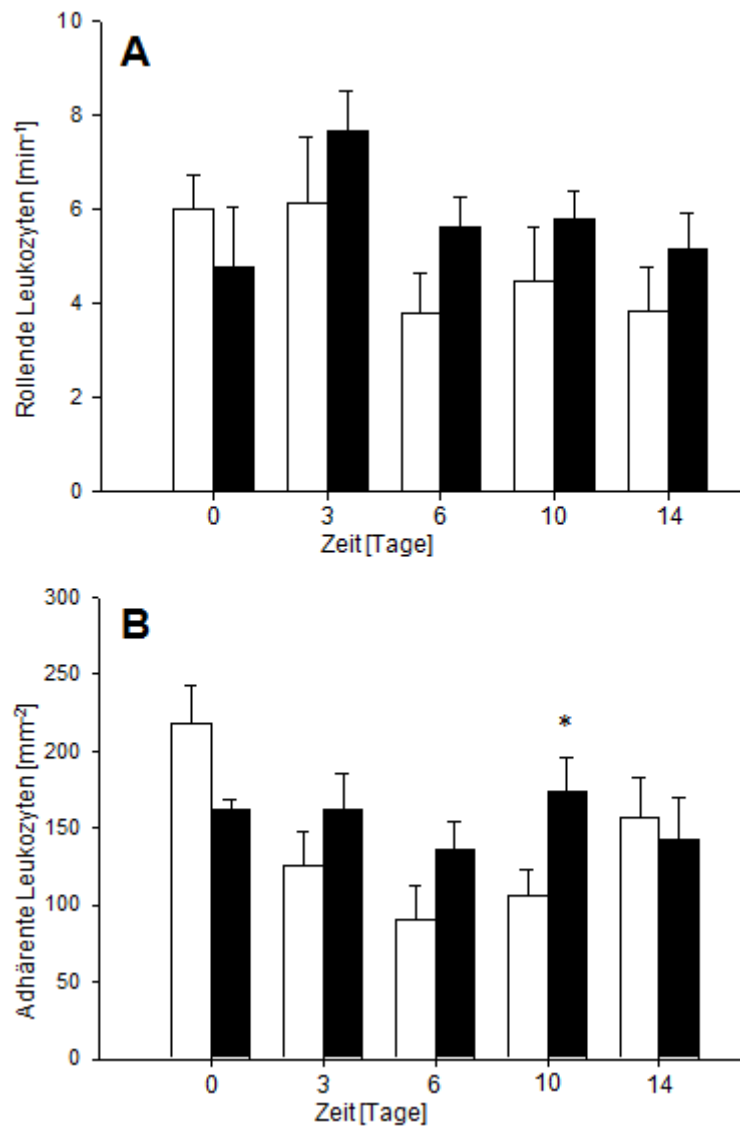


Abbildung 4.4: Die Diagramme A und B zeigen die Anzahl rollender Leukozyten [min⁻¹] und adhärenter Leukozyten [mm⁻²] in postkapillären bzw. Sammelvenolen im Randbereich von Dacron™- (weißer Balken) und Dacron Silver⁺™-Implantaten (schwarzer Balken) an. Die Werte wurden mittels IVM und computergestützter Bildanalyse gewonnen. Die Diagramme zeigen keine relevanten Unterschiede innerhalb der Dacron™ und Dacron Silver⁺™-Gruppe in Bezug auf rollende (A) oder wandständige Leukozyten (B) an den Untersuchungstagen 0, 3, 6, und 14. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. *P<0,05 vs. Dacron™-Implantate.

Während des gesamten 14-tägigen Beobachtungszeitraums wurden 4,0 bis 8,0 min^{-1} rollende Leukozyten und 91-218 wandständige Leukozyten pro mm^2 in Sammelvenolen und postkapillären Venolen gemessen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen DacronTM und der Dacron Silver⁺TM. Die gemessenen Werte zeigten eine physiologische Leukozyten-Endothel-Interaktion, wie sie in einer nicht entzündlichen Rückenhautkammer anzufinden ist (Rücker M et al., 2006; Laschke MW et al., 2007).

4.3.2. Dacron Silver⁺™ im Vergleich mit Dacron Silver^e™

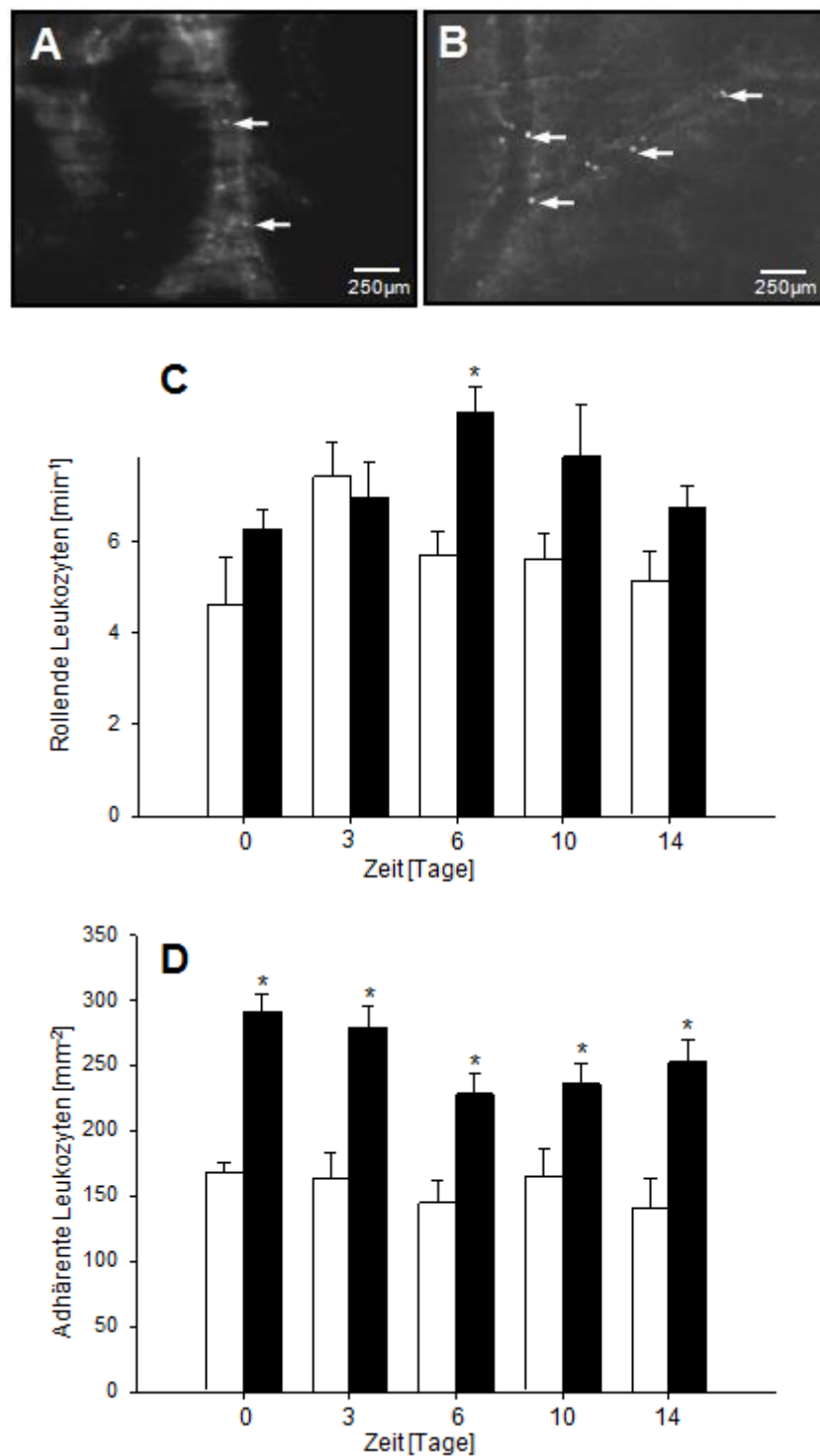


Abbildung 4.5: A und B zeigen intravitalmikroskopische Aufnahmen von Sammelvenolen in unmittelbarer Nähe von Dacron Silver⁺™ (A) und Dacron Silver^e™ (B) in Grünlicht-Epi-Illumination zur Erkennung der mit Rhodamin 6G markierten adhärenen Leukozyten (Pfeile, A und B). Die Diagramme (C und D) zeigen die Anzahl rollender Leukozyten (min⁻¹) und adhärenen Leukozyten

(mm⁻²) in ausgewählten Venolen im Randbereich der Implantate Dacron Silver^{+TM} (weiße Balken, C und D) und Dacron Silver^{eTM} (schwarze Balken, C und D). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. *P<0,05 vs. Dacron Silver^{+TM}-Implantate.

Die Anzahl der rollenden Leukozyten in der Dacron Silver^{+TM} und Dacron Silver^{eTM} lag zwischen 4.8-8.9 min⁻¹. Die Anzahl der gemessenen wandständigen Leukozyten war in der Dacron Silver^{eTM} im Vergleich zu DacronSilver^{+TM} signifikant erhöht. Dies deutete darauf hin, dass im umliegenden Gewebe des Dacron Silver^{eTM}-Implantats eine stärkere inflammatorische Aktivierung der Leukozyten stattgefunden hat (Abbildung 4.5: A-D).

4.4. Inkorporation der Implantate: Dacron™ und Dacron Silver+™

Die histologische Untersuchung des Rückenhautkammerngewebes nach 14 Tagen zeigte, dass sowohl die Dacron™ als auch die Dacron Silver+™ von neugebildetem, vaskularisiertem Granulationsgewebe umgeben waren.

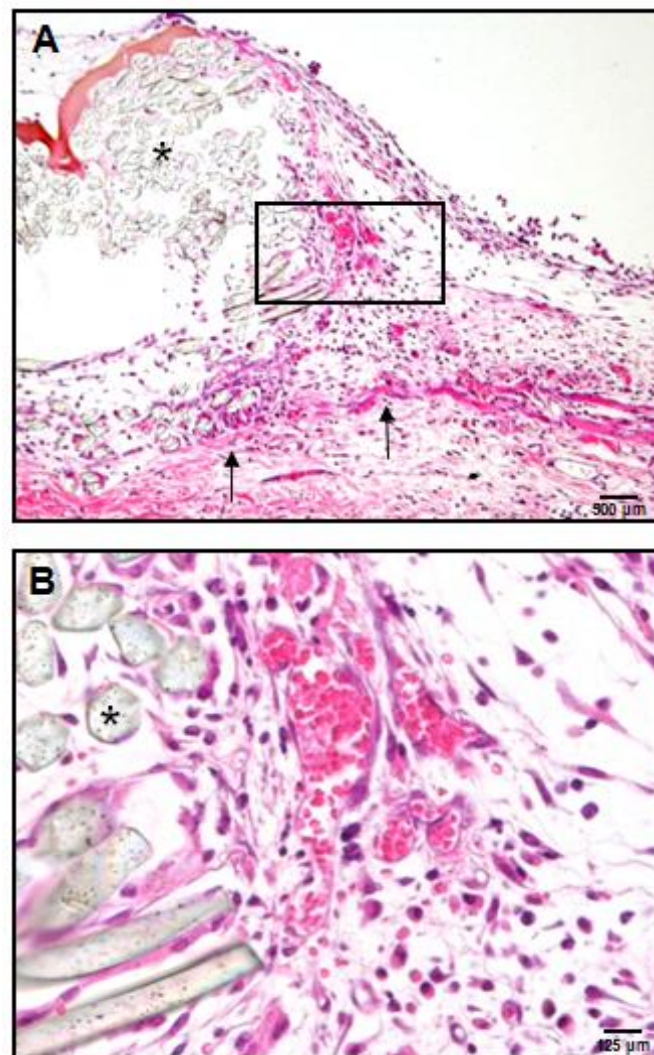


Abbildung 4.6: Die Abbildungen A und B zeigen einen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Querschnitt des Rückenhautkammerngewebes mit einer implantierten Dacron Silver+™-Prothese auf quergestreiftem Muskelgewebe (Pfeile, A) 14 Tage nach Implantation in die RHK einer C57BL/6 Maus. Eine Detailvergrößerung (B) der Grenzfläche zwischen Implantat und dem umliegenden Gewebe (A, schwarzes Rechteck) zeigt die dichte Vaskularisierung, die Bildung von Granulationsgewebe und die Migration von einzelnen Zellen zwischen den Dacronfasern (Sternchen) des Implantats. Die Kapillaren und neugebildeten Gefäße sind gefüllt mit zahlreichen Erythrozyten.

Das Granulationsgewebe wuchs in die Zwischenräume der Fasern der gewirkten DacronTM- und Darcon Silver^{+TM}-Prothesenimplantate ein. Dieser Prozess der Migration von Zellen in das Implantat förderte die Inkorporation der Gefäßprothesen in das Gewebe des Implantatbettes der Rückenhautkammer.

4.5. Kollagenbildung, Regeneration und Apoptose: Dacron™ im Vergleich mit Dacron Silver⁺™

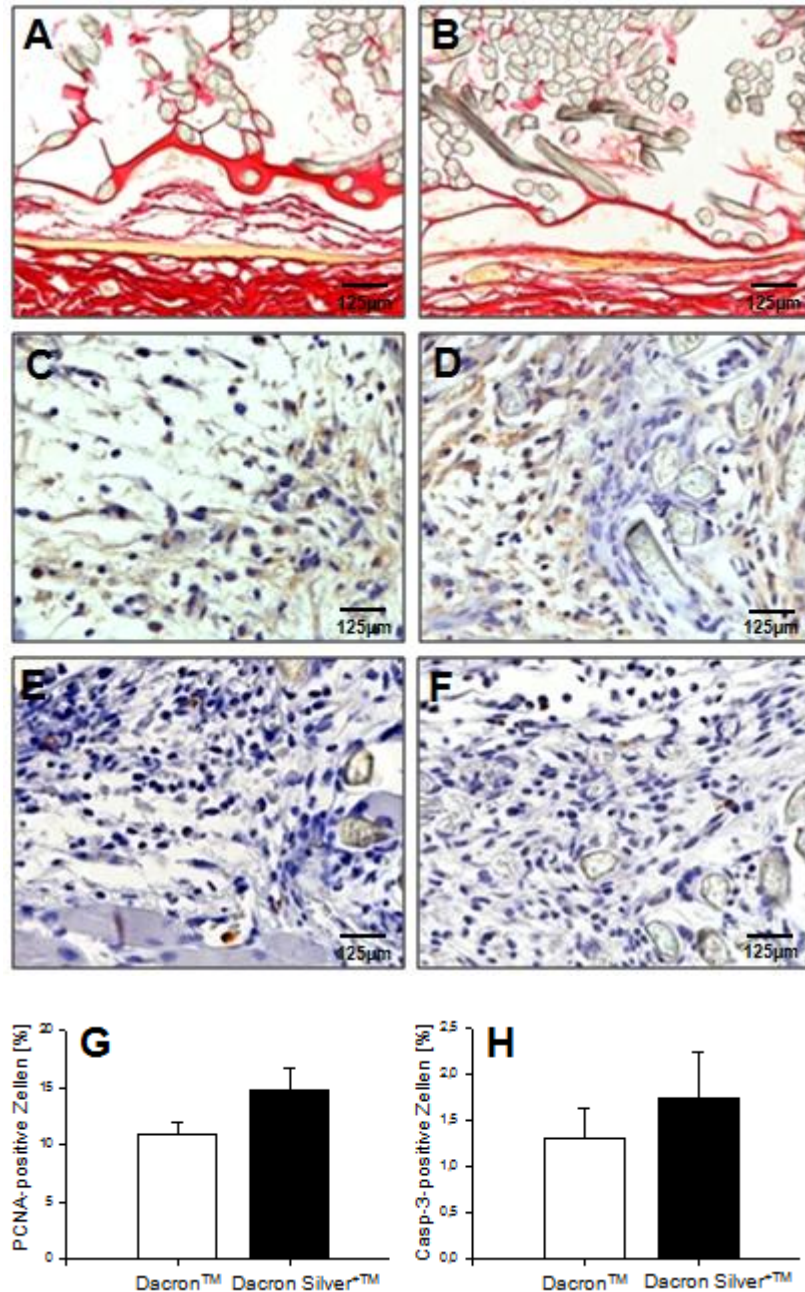


Abbildung 4.7 zeigt histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitete Gewebeschnitte aus dem Randbereich von Dacron™- (A, C und E) und Dacron Silver⁺™-Implantaten (B, D und F) 14 Tage nach Implantation in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Präparate wurden mit Siriusrot (A und B) gefärbt, um neugebildete Kollagenfasern im Randbereich des Implantats sichtbar zu machen. Außerdem wurden die Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen PCNA (C und D) und Antikörpern gegen Caspase-3 (E und F) markiert, um sowohl proliferierende als auch apoptotische Zellen innerhalb der Auswertungsbereiche erkennen zu können. Die Diagramme zeigen die Menge PCNA-

positiver Zellen (G, angegeben in %) und die Menge Caspase-3-positiver Zellen (H, angegeben in %) innerhalb der Analysefelder der DacronTM- (weiße Balken, n=8; G und H) und Dacron Silver^{+TM}-Gefäßprothesen an Tag 14 nach Implantation (schwarze Balken, n=8; G und H). Die Daten werden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Eine Siriusrot-Färbung an Tag 14 nach Implantation konnte nachweisen, dass es in der direkten Implantationsumgebung zu einer Bildung von Kollagenfasern gekommen war. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen DacronTM und DacronSilver^{+TM}. Die immunhistochemischen Nachweise von PCNA und Caspase-3 zeigten einen Anteil von 11-15% proliferierenden und 1-2% apoptotischer Zellen innerhalb des neugebildeten Granulationsgewebes. Die Anzahl apoptotischer Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen.

4.6. Zellproliferation und Apoptose: Dacron Silver^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver^{eTM}

Die Analyse der PCNA Immunhistochemie zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl PCNA-positiver, proliferierender Zellen in der Dacron Silver^{+TM}-Gruppe im Vergleich mit der Dacron Silver^{eTM}-Gruppe an Tag 14 nach Implantation (Abbildung 4.8 A-C).

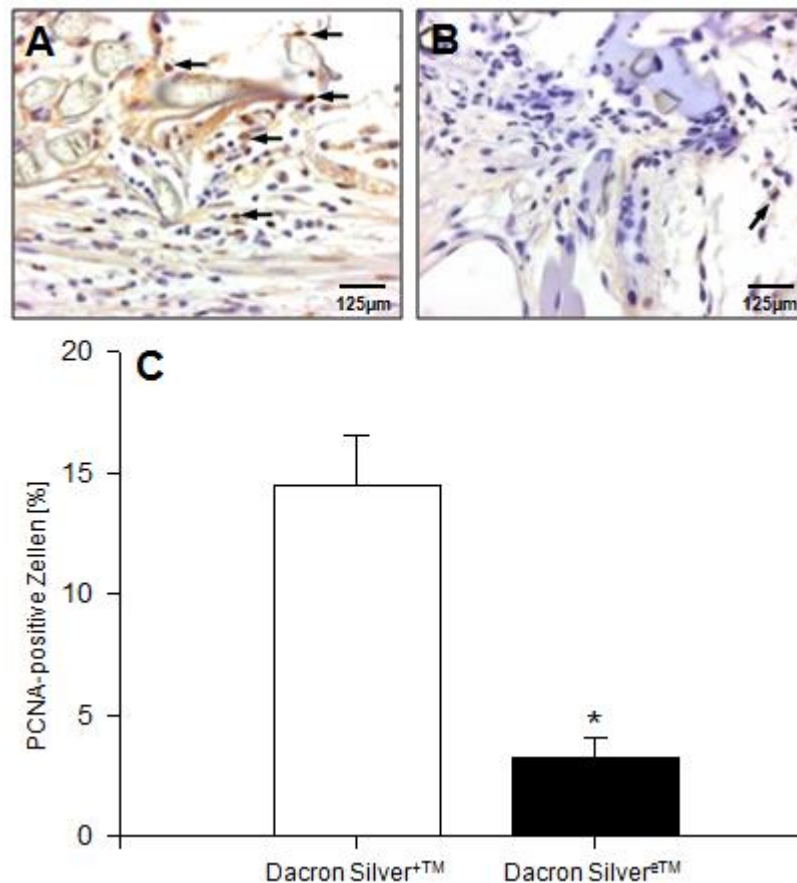


Abbildung 4.8: A und B zeigen Ausschnitte immunhistochemisch bearbeiteter Querschnitte einer Rückenhautkammer aus dem Randbereich eines Dacron Silver^{+TM}- (A) und eines Dacron Silver^{eTM}-Implantats (B) 14 Tage nach Implantation auf die quergestreifte Muskulatur innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Zur Erkennung proliferierender Zellen (Pfeile, A) wurden die Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen PCNA markiert. Das Diagramm (C) zeigt die Anzahl PCNA-positiver Zellen (angegeben in %) innerhalb der Analysefelder von Dacron Silver^{+TM} (weißer Balken; n=8) und Dacron Silver^{eTM} (schwarzer Balken, n=8) 14 Tage nach Implantation. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. *P<0.05 vs. Dacron Silver^{+TM}.

Im Gegensatz dazu ergab die immunhistochemische Auswertung der Caspase-3 positiven Zellen im Rückenhautkammerngewebe keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen Dacron Silver⁺™ und Dacron Silver^e™ (Abbildung 4.9 A-C). Die Anzahl der apoptotischen Zellen waren im Durchschnitt mit 2-3% als niedrig einzustufen.

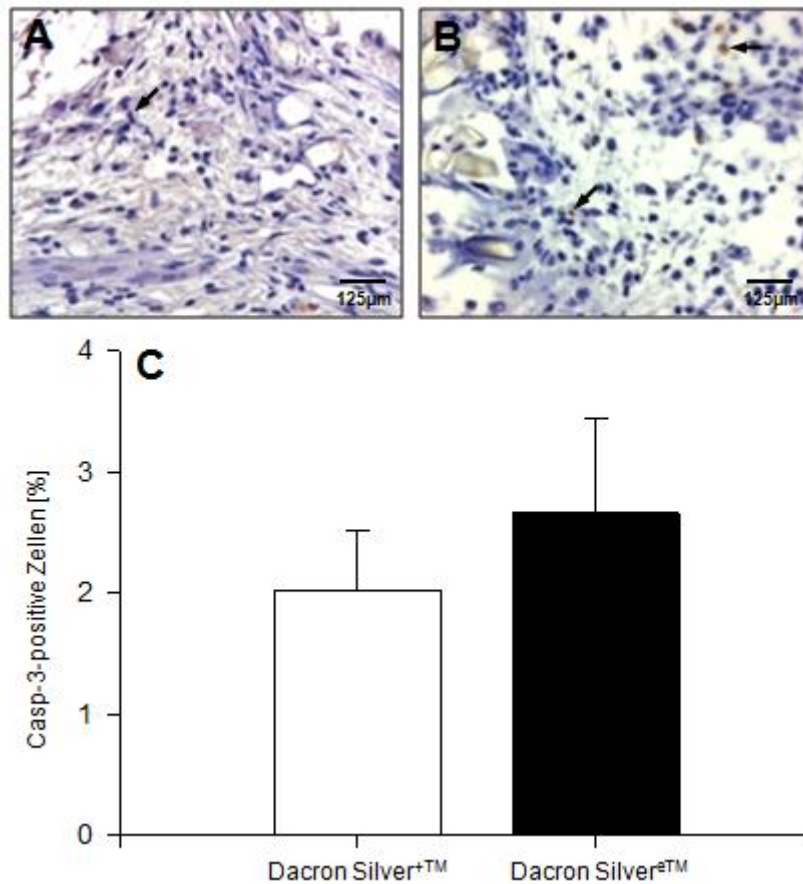


Abbildung 4.9: A und B zeigen Ausschnitte immunhistochemisch bearbeiteter Querschnitte einer Rückenhautkammer aus dem Randbereich eines Dacron Silver⁺™- (A) und eines Dacron Silver^e™-Implantats (B) 14 Tage nach Implantation auf die quergestreifte Muskulatur innerhalb der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Casp-3-Antikörper markiert um apoptotische Zellen innerhalb der Analyseareale erkennen zu können (Pfeile). Das Diagramm (C) zeigt die Anzahl PCNA-positiver Zellen (angegeben in %) innerhalb der Analysefelder von Dacron Silver⁺™ (weißer Balken; n=8) und Dacron Silver^e™ (schwarzer Balken, n=8) 14 Tage nach Implantation. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben.

5. Diskussion

Wir verwendeten für unsere Experimente das in der Mikrozirkulationsforschung etablierte Rückenhautkammermodell der Maus. Das Rückenhautkammermodell hat sich nachweislich als eine geeignete Methode herausgestellt um die In-vivo-Performance von Gefäßprothesen zu untersuchen. In einer Studie von Menger MD et al. wurden bereits verschiedene Gefäßprothesen (Solco®, Omniflow®, e-PTFE®) am Rückenhautkammermodell des Syrischen Goldhamsters untersucht (Menger MD et al., 1992). Das Rückenhautkammermodell ermöglicht mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie eine Beurteilung der Angiogenese und der frühen Entzündungsreaktion im Gewebe der Rückenhautkammer. Somit kann die Reaktion des Gewebes auf die Implantation von verschiedenen Biomaterialien über einen Zeitraum von zwei Wochen an ausgewählten Untersuchungstagen am lebenden Tier repetitiv untersucht werden (Laschke MW et al., 2011). Das Modell besitzt im Gegensatz zu histologischen Untersuchungen von Geweben den Vorteil, dass das Rückenhautkammermodell als In-vivo-Verfahren einen direkten Einblick in die dynamischen Prozesse gewährt, die im Gewebe im Bereich der Gefäßprothesenimplantate ablaufen. Gefäßneubildung, Mikrohämodynamik können nicht nur am Ende eines Versuches, sondern während eines Zeitraumes von 14 Tagen im Verlauf gemessen und beurteilt werden. Da das Gefäßprothesenimplantat mit einer Oberfläche von 2 mm² in das Zentrum der Rückenhautkammer gelegt wird, entgeht das unter dem Implantat gelegene Gewebe der intravitalmikroskopischen Mitbeurteilung, obwohl dieser subprothetische Bereich von großem Interesse wäre. Das subprothetische Areal ist lediglich durch histologische Gewebeproben beurteilbar. Das Implantat wurde mit der äußeren Prothesenoberfläche auf das Rückenhautkammerngewebe aufgebracht, um einerseits die Oberfläche und die unterschiedlichen Beschichtungen direkt mit dem Gewebe in Kontakt zu bringen. Dies entspricht somit noch am ehesten der Situation im Organismus, ist jedoch von einer Implantation End-zu-End wie es bei einer Rohrprothese der Fall ist weit entfernt. Die intravitalmikroskopische Analyse der Vaskularisierung und Inflammation ist auf einen Zeitraum von 14 Tagen begrenzt. Für Zeiträume, die darüber hinausgehen ist das Modell nicht geeignet.

5.1. Dacron™ im Vergleich mit Dacron Silver⁺™

Nach Implantation einer Gefäßprothese beginnt der Prozess der Integration des Fremdmaterials im Gewebe des Empfängers. Im Rahmen dieses Einheilungsprozesses sind die rasche und möglichst ausgedehnte Entstehung von Gefäßaussprossungen und

Gefäßneubildungen von zentraler Bedeutung. Die neugebildeten Gefäße schließen sich zu Netzwerken aus Gefäßen zusammen, die den Grenzbereich des Implantats und das Implantat selbst bedecken. Die adäquate Vaskularisierung ist eine wichtige Voraussetzung und ein Baustein bei der Verhinderung von Gefäßprotheseninfektionen. Denn eine nicht ausreichende Inkorporation einer Prothese, die mit einer nur schwach ausgeprägten Vaskularisierung in Zusammenhang steht, wurde schon häufig als eine der Gründe für die Entstehung von Gefäßprotheseninfektion diskutiert (Menger MD et al., 1992). Bereits Gristina beschrieb die Inkorporation und Integration von Fremdmaterial im Gewebe als einen Wettlauf zwischen bakterieller Adhäsion und der Gewebeintegration der Oberfläche des Fremdmaterials. Eine mit Zellen bedeckte und gut integrierte Implantatoberfläche bietet Schutz und besitzt weniger Angriffsfläche für Bakterien. Die Besiedlung des Implantats durch Bakterien wird dadurch erschwert (Gristina AG, 1987).

Zahlreiche Faktoren können den Integrationsprozess von Gefäßprothesenimplantaten beeinflussen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass zum Beispiel die Porösität der Gefäßprothese ein wichtiger Einflussfaktor bei der Einheilung darstellt. Poröse Gefäßprothesen sind besser vaskularisiert als Implantate mit glatter Oberfläche (Wu MH et al., 1996).

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die Vaskularisierung einer DacronTM-Gefäßprothese durch die Beschichtung der Oberfläche mit Silberazetat zusätzlich verbessert werden kann. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Silberazetat, welches von der Implantatoberfläche an das Gewebe abgegeben wird, die Angiogenese fördert ohne dadurch eine relevante Entzündungsreaktion im Gewebe des Empfängers auszulösen.

Über den Zusammenhang zwischen Silberbeschichtung und erhöhter Kapillardichte im Gewebe ist bis heute wenig bekannt. Deshalb ist es wichtig die chemischen Vorgänge im Gewebe in Anwesenheit des Silbers besser zu verstehen. Silberazetat ist ein Silbersalz und ein hydrophiles Kation mit Redoxpotential. In einem feuchten Milieu entsteht durch Oxidation positiv geladene Silberionen Ag^+ . Diese Silberionen sind sehr reaktiv und können mit anderen Ionen interagieren. Durch diese Eigenschaften können Silberionen Zellfunktionen verändern, in den Zellmetabolismus und auch in biologische Abläufe eingreifen und diese beeinflussen beziehungsweise verändern. Die Silberionen besitzen die Fähigkeit an unterschiedliche Moleküle wie zum Beispiel Phospholipide in Zellmembranen, Enzyme oder Nukleinsäuren zu binden. Die Aktivierung von Ionenkanälen oder anderen Signaltransduktionswegen sind ebenfalls Ansatzpunkte für die Wirkungsweise von Silberionen (Mouriño V et al., 2012). Silberazetat wird in erster Linie aufgrund der bereits erwähnten antibakteriellen Wirkungen gemeinhin als Beschichtung für Dacronprothesen

verwendet. Es steht zur Diskussion, ob Silber auch unter In-vivo Bedingungen die gleiche antibakterielle Effektivität besitzt wie das in vitro bereits nachgewiesen werden konnte. Ricco JB et al. geht davon aus, dass aufgrund veränderter Bedingungen im lebenden Organismus und biologischer Vorgänge die antimikrobielle Aktivität der Silberionen deutlich herabgesetzt ist (Ricco JB et Assadian O, 2011). Unter biologischen Voraussetzungen lagern sich Proteine, wie etwa Albumin auf der Prothesenoberfläche ab und binden an Silberionen, die dadurch ihre antibakterielle Wirksamkeit verlieren (Williams RL et Williams DF, 1988). Zudem kommt es aufgrund hoher Chloridkonzentrationen im menschlichen Körper zu einer verstärkten Umwandlung von Silberazetat zu Silberchlorid was wiederum die Verfügbarkeit von Silberionen herabsetzt (Weast RC et al., 1983).

Indes weiß man bis heute wenig über die Auswirkungen der Silberazetatbeschichtung auf das Einwachsverhalten der Implantate, sieht man von den antibakteriellen Eigenschaften des Silbers einmal ab (Gordon O et al., 2010; Peetsch A et al., 2012). Interessanterweise konnten wir herausfinden, dass die Silberazetatbeschichtung der Dacron Silver⁺TM-Prothesen das Einwachsen von Mikrogefäßen in die Implantate stimuliert.

Dieser Befund könnte möglicherweise durch einen proangiogenen Effekt des Silbers erklärt werden. Kang et al. konnte bereits nachweisen, dass Silbernanopartikel (AgNPs) in der Lage sind in vivo und in vitro angiogene Effekte zu induzieren. In vivo zeigte sich dies durch die verstärkte Bildung von Gefäßen auf einem in C57/Black6 Mäuse injiziertem Matrigel und durch den Nachweis endothelialer Zellen innerhalb des Matrigels. Auch unter in vitro Bedingungen kam es durch die AgNPs zu einer verstärkten Angiogenese auf Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel (Kang et al., 2011).

Weiter beschreibt Kang et al., dass AgNPs die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Freisetzung von vaskulärem endothelalem Wachstumsfaktor und Stickstoffmonoxid (NO) aus endothelialen SVEC4-10 Zellen induzieren (Kang et al., 2011).

AgNPs geben von ihrer Oberfläche ebenfalls Silberionen ab und unter In-vivo-Bedingungen stellt sich in der Regel ein chemisches Gleichgewicht zwischen elementarem und ionisiertem Zustand von Silber ein (Wijnhoven S et al., 2009). Somit könnten einige der beschriebenen Effekte der AgNPs auf ionisiertes Silberazetat übertragbar sein und eine mögliche Erklärung dafür, weshalb es im Gewebe der Gruppe Dacron Silver⁺TM zu einer verstärkten Gefäßneubildung in Anwesenheit der Silberionen kommt.

Andererseits weiß man, dass eine Entzündung ebenfalls ein wesentlicher Stimulus für die Ausbildung von neuen Mikrogefäßen sein kann (Rücker M et al., 2006). Dieser Entzündungsreiz kann durch die Implantation eines Fremdkörpers in das Empfängergewebe

ausgelöst werden. Silber kommt auch als Auslöser einer proinflammatorischen Gewebereaktion in Betracht. Locht LJ et al. beschreibt, dass Silberionen, die von Oberflächen abgegeben werden, eine proinflammatorische Reaktion und Apoptose in Makrophagen hervorrufen (Locht LJ et al., 2011). Die histologischen Ergebnisse sowie die intravitalmikroskopisch analysierte leukozytäre Entzündungsreaktion unterstützt die These des inflammatorisch getriggerten Stimulus für Gefäßneubildung jedoch nicht.

In unserer Studie konnte keine relevante leukozytäre Entzündungsreaktion auf die Dacron Silver⁺TM-Implantate im Gewebe der Rückenhautkammer festgestellt werden. In beiden experimentellen Gruppen, DacronTM und Dacron Silver⁺TM, fand sich eine vergleichbare Anzahl an rollenden und wandständigen Leukozyten, wie sie für physiologische Bedingungen innerhalb der Rückenhautkammer typisch sind (Rücker M et al., 2006; Laschke MW et al., 2007). Eine leicht erhöhte Anzahl wandständiger Leukozyten am Tag der Implantation kann man durch eine leichte entzündliche Reaktion des Gewebes auf das chirurgische Trauma erklären, wie es 48 Stunden zuvor durch die Präparation hervorgerufen wurde.

Neben den In-vivo-Analysen der Vaskularisierung wurden auch Kollagenformation, Zellproliferation und Apoptose innerhalb des neugebildeten Granulationsgewebes am 14. Tag nach Implantation der Gefäßprothesen analysiert. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen unbeschichteter DacronTM und der mit Silberazetat beschichteten Dacron Silver⁺TM. Dies ist eine interessante Entdeckung, wenn man bedenkt, dass höhere Silberkonzentrationen nachweislich zytotoxische und Apoptose induzierende Effekte auslösen können (Gordon O et al., 2010). Man geht in diesem Zusammenhang von einer dosisabhängigen Zytotoxizität des Silbers aus. Es wird angenommen, dass die zytotoxische Silberkonzentration für menschliche Zellen im Bereich von 1,6 ppm liegt (Saravanapavan P et al., 2004).

Die Silberabgabe der Dacron Silver⁺TM-Prothese scheint diese zytotoxischen und Apoptose induzierenden Konzentrationen nicht zu erreichen. Dies spricht für die Biokompatibilität der Dacron-Silver⁺TM-Prothesen. Dieser Eindruck wird durch weitere Erkenntnisse unterstützt, die durch die histologischen Untersuchungen gewonnen werden konnten. Die Ausbildung eines fibrovaskulären Granulationsgewebes, das im Randbereich und auch innerhalb der einzelnen Dacronfasern der Implantate nachweisbar war, interpretierten wir als Ausdruck einer verbesserten Inkorporation der Prothese im Implantatbett. Die umfassende Inkorporation eingebettet in ein Netzwerk aus Gefäßen, Zellen und Granulationsgewebe ist die Grundvoraussetzung für die Haltbarkeit und Widerstandsfähigkeit gegen Infektion und Abstoßung nach einem chirurgischen Eingriff (Borrero E et Doscher W, 1988; Silva EA et al.,

2004). Desweiteren gewährleistet das Netzwerk aus neugebildeten Gefäßen den Transport von Nährstoffen, Sauerstoff und Zellen (Bae H et al., 2012). Insbesondere die zwischen den Dacronfasern und im Randbereich der Implantate lokalisierten Fibroblasten und Fibrozyten sind entscheidend an dem Einheilungsprozess der Implantate beteiligt. Die Fibrozyten und Fibroblasten besiedeln die Oberfläche der Gefäßprothesen und schützen sie somit vor einer Kolonisation durch Bakterien (Cleary MA et al., 2012).

Neben den bekannten antimikrobiellen Eigenschaften bewirkt die Oberflächenbeschichtung mit Silberazetat eine frühere Inkorporation im Gewebe des Empfängers, die auf einer verbesserten Vaskularisierung des Implantats beruht. Die rasche und ausgedehnte Vaskularisierung der Prothese ist eine der notwendigen Voraussetzungen, damit eine erfolgreiche Inkorporation im Gewebe des Empfängers erfolgen kann (Bae H et al., 2012). Die Erkenntnis, dass die Silberbeschichtung eine verbesserte frühe Inkorporation der Prothese im Gewebe bewirkt ohne dabei gleichzeitig eine relevante Entzündungsreaktion hervorzurufen, kann einen Beitrag zur Vermeidung von Gefäßprotheseninfektionen leisten.

5.2. Dacron Silver^{+TM} im Vergleich mit Dacron Silver^{eTM}

Die Infektionsraten biologischer Gefäßersatzmaterialien sind niedriger als bei den verwendeten synthetischen Gefäßprothesen (Jackson MR et al., 2004). Um die gefürchteten und verheerenden Folgen einer Gefäßprotheseninfektion vorzubeugen, sind alloplastische Gefäßprothesen mit unterschiedlichen antibakteriellen Oberflächenbeschichtungen ausgestattet worden. Zwei Gefäßprothesen, die mit antibakteriellem Silber beschichtet sind, sind seit einigen Jahren bereits im klinischen Gebrauch. Dacron Silver^{+TM} und Dacron Silver^{eTM} besitzen jeweils eine Silberbeschichtung. Die Beschichtungen unterscheiden sich jedoch deutlich in Bezug auf die Menge an Silberionen, die die Oberfläche an das Gewebe abgeben (Zegelman M et al., 2009; Ricco JB et al., 2006). Die mit Silberazetat beschichtete Dacron Silver^{+TM} gibt im Verlauf nahezu die gesamte Menge an Silberazetat an das Gewebe ab. Direkt nach Implantation erfolgt eine kontinuierliche Abgabe von Silberionen über einen Zeitraum von 30 Tagen. Danach ist die Prothese als eine normale Dacronprothese anzusehen, die keinen antibakteriellen Schutz mehr aufweist (Diener H et al., 2009). Die antimikrobielle Wirksamkeit der Oberflächenbeschichtung ist somit zeitlich auf die Dauer der Silberabgabe begrenzt (Schneider F et al., 2008; Ha H et Payer J, 2011). Die Dacron Silver^{eTM} Prothese hingegen verfügt über eine andere Art der Silberbeschichtung: Die Oberfläche der Prothese wurde mit metallischem Silber vaporisiert. Bei dieser Variante der Silberbeschichtung verharrt das elementare Silber auf der Prothesenoberfläche und gibt nur

in geringen Mengen Silberionen an das Gewebe ab. Entsprechend entsteht durch diese zur Dacron Silver⁺™ gegensätzliche Silberabgabedynamik eine weitaus längere antibakterielle Wirksamkeit auf der Oberfläche des Implantats. Allerdings besteht aufgrund der geringen Abgabe von Silberionen im Gewebe wenig Schutz gegen Bakterien (Ueberrueck T et al., 2005; Schierholz JM et al., 1998). Ricco JB et Assadian O stellten deshalb bereits zur Diskussion, ob die Silber abgebende Dacron Silver⁺™ insbesondere bei Infektkonstellationen verwendet werden sollte, um sich den antimikrobiellen Effekt der Silberionen auch im Gewebe zunutze zu machen. Der bereits erwähnte protektive Langzeiteffekt der Dacron Silver^e™ könnte somit eher für einen präventiven Einsatz geeignet sein um noch Wochen und Monate nach Implantation eine Besiedlung der Oberfläche durch Bakterien zu verhindern (Ricco JB et Assadian O, 2011).

In der ersten Versuchsreihe konnten wir bereits zeigen, dass die mit Silberazetat beschichtete Dacron Silver⁺™ im Vergleich mit unbeschichteten Dacron[™] eine verbesserte Vaskularisierung und Gewebeintegration aufweist (Jeanmonod P et al., 2013). In den nachfolgenden Versuchen, in denen zwei unterschiedliche Silberbeschichtungen miteinander verglichen wurden, konnte der Nachweis erbracht werden, dass Vaskularisierung und Entzündungsreaktion im Empfängergewebe in erster Linie nicht nur von der Silberbeschichtung abhängig ist, sondern vielmehr von der Dynamik der Silberabgabe in das Gewebe. Denn unsere Ergebnisse zeigen, dass die mit metallischem Silber vaporisierte Dacron Silver^e™ eine signifikant reduzierte Vaskularisierung im Vergleich mit Dacron Silver⁺™ aufweist. Außerdem fand sich eine signifikant geringere Anzahl PCNA-positiver Zellen im Gewebe der Dacron Silver^e™. Dieser Zusammenhang zwischen reduzierter Kapillardichte und verringerter Anzahl proliferierender Zellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Ausmaß der Vaskularisierung direkt mit der Qualität der Inkorporation der Gefäßprothese im Implantatbett in Zusammenhang steht.

Außerdem zeigten die Auswertungen der intravitalmikroskopischen Untersuchungen eine erhöhte Anzahl wandständiger Leukozyten in der Gruppe Dacron Silver^e™. Aufgrund vergleichbarer mikrohämodynamischer Parameter innerhalb der beiden Versuchsgruppen ist die verstärkte Adhärenz der Leukozyten an das Endothel der Venolen nicht auf die hämodynamischen Bedingungen zurückzuführen. Dies ist eher als eine verstärkte leukozytäre Entzündungsreaktion in der direkten Umgebung des Implantats zu interpretieren. Die Dacron Silver^e™ Prothese scheint trotz der geringen Silberabgabe an das Gewebe proinflammatorische Vorgänge innerhalb der Rückenhautkammer auszulösen. Trotzdem ist die Dacron Silver^e™ als biokompatibel einzuordnen, da sich die gemessenen Werte während des gesamten Untersuchungszeitraums stets unterhalb 300 Zellen pro mm² befanden. Die

Werte sind deutlich niedriger als die Anzahl adhärenter Leukozyten, die üblicherweise in einer entzündeten Rückenhautkammer gemessen werden. Erfahrungsgemäß würde man in einer entzündeten Rückenhautkammer Werte um die 700 Leukozyten pro mm^2 erwarten (Rücker M et al., 2006; Westermann S et al., 1999; Sethi S et al., 2011).

Sowohl in der Gruppe Dacron Silver^{eTM} als auch bei Dacron Silver^{+TM} war nur eine geringe Anzahl Caspase-3-positiver apoptotischer Zellen im Granulationsgewebe nachweisbar. Dies ist ein Indikator für nur schwach ausgeprägte zytotoxische Effekte, welche die beiden Silberbeschichtungen im Gewebe ausgelöst haben.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Beschichtung mit Silberazetat die Integration im Empfängergewebe positiv beeinflusst. Der Vergleich der beiden unterschiedlichen Silberbeschichtungen auf gewirkten Dacronprothesen hat gezeigt, dass sich diese in Bezug auf ihr Integrationsverhalten voneinander unterscheiden. Die Unterschiede in Bezug auf die Vaskularisierung der Gefäßprothesen führen wir auf die minimale Silberabgabe der Dacron Silver^{eTM} zurück. Die Dynamik und die Menge der Silberabgabe an das Gewebe scheinen in Bezug auf die Integration im Empfängergewebe von Bedeutung zu sein. Es wird in der Zukunft von entscheidender Bedeutung sein die Oberflächen der Gefäßprothesen so zu modifizieren, dass eine kontrollierte Abgabe von Silberionen an das Gewebe auch über einen längeren Zeitraum gewährleistet ist ohne dabei zytotoxische bzw. antibakterielle Wirkspiegel zu über- oder unterschreiten (Kumar R et Münstedt H, 2005; Monteiro DR et al., 2009).

6. Literaturverzeichnis

1. Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15: 85-91.
2. Bae H, Puranik AS, Gauvin R, Edalat F, Carrillo-Conde B, Peppas NA, Khademhosseini A. Building vascular networks. *Sci Transl Med* 2012; 4: 160ps23.
3. Bandyk DF, Esses GE. Prosthetic Graft Infection. *Surg Clin North Am* 1994; 74: 571-590. Review.
4. Bendermacher BL, Teijink JA, Willigendael EM, Bartelink ML, Peters RJ, de Bie RA, Büller HR, Boiten J, Langenberg M, Prins MH. A clinical prediction model for the presence of peripheral arterial disease - the benefit of screening individuals before initiation of measurement of the ankle-brachial index: an observational study. *Vasc Med* 2007; 12:5-11.
5. Biro G, Szabo G, Fehevari M, Münch Z, Szeberin Z, Acsady G. Late outcome following open surgical management of secondary aortoenteric fistula. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 8: 1221-1229.
6. Borrero E, Doscher W. Chronic perigraft seromas in PTFE grafts. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1988; 29: 46-49.
7. Calligaro KD, Veith FJ, Schwartz ML, Dougherty MJ, DeLaurentis DA. Differences in early versus late extracavitary arterial graft infections. *J Vasc Surg* 1995; 22: 680-688.
8. Chlupác J, Filová E, Bacáková L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res* 2009; 58: 119-139. Review.
9. Cleary MA, Geiger E, Grady C, Best C, Naito Y, Breuer C. Vascular tissue engineering: the next generation. *Trends Mol Med* 2012; 18: 394-404. Review.
10. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 82-89.
11. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322. Review.
12. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004; 350: 1422-1429.

13. Diehm C, Schuster A, Allenberg JR, Darius H, Haberl R, Lange S, Pittrow D, von Stritzky B, Tepohl G, Trampisch HJ. High prevalence of peripheral arterial disease and comorbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis* 2004; 172: 95-105.
14. Ducasse E, Calisti A, Speziale F, Rizzo L, Misuraca M, Fiorani P. Aortoiliac stent graft infection: current problems and management. *Ann Vasc Surg* 2004; 18: 521-526.
15. Edwards WH Jr, Martin RS 3rd, Jenkins JM, Edwards WH Sr, Mulherin JL Jr. Primary graft infections. *J Vasc Surg* 1987; 6: 235-239.
16. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 2000; 52: 662-668.
17. FitzGerald SF, Kelly C, Humphreys H. Diagnosis and treatment of prosthetic aortic graft infections: confusion and inconsistency in the absence of evidence or consensus. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 996-999.
18. Frei E, Hodgkiss-Harlow K, Rossi PJ, Edmiston CE Jr, Bandyk DF. Microbial pathogenesis of bacterial biofilms: a causative factor of vascular surgical site infection. *Vasc Endovascular Surg* 2011; 45: 688-696.
19. Gao H, Sandermann J, Prag J, Lund L, Lindholt JS. Prevention of primary vascular graft infection with silver-coated polyester graft in a porcine model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010; 39: 472-477.
20. Gao H, Sandermann J, Prag J, Lund L, Lindholt JS. Rifampicin-soaked silver polyester versus expanded polytetrafluoro-ethylene grafts for in situ replacement of infected grafts in a porcine randomised controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012; 43: 582-587.
21. Goëau-Brissonnière OA, Fabre D, Leflon-Guibout V, Di Centa I, Nicolas-Chanoine MH, Coggia M. Comparison of the resistance to infection of rifampin-bonded gelatin-sealed and silver/collagen-coated polyester prostheses. *J Vasc Surg*. 2002; 35:1260-1263.
22. Gordon O, Vig Slenters T, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, Landmann R, Fromm KM. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4028-4218.
23. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1367-1378. Review.
24. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987; 237: 1588-1595.

-
25. Ha H, Payer J. The Effect of Silver Chloride Formation on the Kinetics of Silver Dissolution in Chloride Solution. *Electrochim Acta* 2011; 56: 2781-2791.
 26. Hardman S, Cope A, Swann A, Bell PR, Naylor AR, Hayes PD. An in vitro model to compare the antimicrobial activity of silver-coated versus rifampicin-soaked vascular grafts. *Ann Vasc Surg* 2004; 18: 308-313.
 27. Hasse B, Husmann L, Zinkernagel A, Weber R, Lachat M, Mayer D. Vascular Graft Infections. *Swiss Med Wkly* 2013; 143: 13754. Review.
 28. Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev* 2006; 35: 780-789. Review.
 29. Hicks RC, Greenhalgh RM. The Pathogenesis of Vascular Graft Infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14: 5-9.
 30. Jackson MR, Ali AT, Bell C, Modrall JG, Welborn MB 3rd, Scoggins E, Valentine RJ, D'Addio VJ, Clagett GP. Aortofemoral bypass in young patients with premature atherosclerosis: is superficial femoral vein superior to Dacron? *J Vasc Surg* 2004; 40: 17-23.
 31. Jeanmonod P, Laschke MW, Gola N, von Heesen M, Glanemann M, Dold S, Menger MD, Moussavian MR. Silver acetate coating promotes early vascularization of Dacron vascular grafts without inducing host tissue inflammation. *J Vasc Surg* 2013; 58: 1637-1643.
 32. Jin X, Li M, Wang J, Marambio-Jones C, Peng F, Huang X, Damoiseaux R, Hoek EM. High-throughput screening silver nanoparticle stability and bacterial inactivation in aquatic media: influence of specific ions. *Environ Sci Technol* 2010; 44:7321-7328.
 33. Kang K, Lim DH, Choi IH, Kang T, Lee K, Moon EY, Yang Y, Lee MS, Lim JS. Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles. *Toxicol Lett* 2011; 10: 227-234.
 34. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 4: 357-362. Review.
 35. Knosalla C. Experimentelle und klinische Untersuchungen über den Gebrauch von Allograft-Material zur in situ-Behandlung von Infektionen im Bereich der Aorta. Med. Habil.-Schr. Medizinische Fakultät, Charité Berlin, 2000.
 36. Kröger K. Epidemiologie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Was ist gesichert und was ist offen? *Hamostaseologie*. 2006; 26:193-196.

37. Kröger K, Stang A, Kondratieva J, Moebus S., Beck E, Schermund A, Möhlenkamp S, Dragano N, Siegrist J, Jöckel KH, Erbel R; Heinz-Nixdorf-Study-Group. Prevalence of peripheral arterial disease - results of the Heinz Nixdorf Recall Study. *Eur J Epidemiology* 2006; 21:279-285.
38. Kumar R, Münstedt H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials* 2005; 26: 2081-2088.
39. Lanzer P. Vascular multimorbidity in patients with a documented coronary artery disease. *Z Kardiol* 2003; 92: 650-659.
40. Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 82: 494-505.
41. Laschke MW, Vollmar B, Menger MD. The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 2011; 22: 147-167.
42. Leroy O, Meybeck A, Sarraz-Bournet B, d'Elia P, Legout L. Vascular graft infections. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 2: 154-158. Review.
43. Loch LJ, Smidt K, Rungby J, Stoltenberg M, Larsen A. Uptake of silver from metallic surfaces induces cell death and a pro-inflammatory response in cultured J774 macrophages. *Histol Histopathol* 2011; 26: 689-697.
44. Lorentzen JE, Nielsen OM, Arendrup H, Kimose HH, Bille S, Andersen J, Jensen CH, Jacobsen F, Røder OC. Vascular graft infection: an analysis of sixty-two graft infections in 2411 consecutively implanted synthetic vascular grafts. *Surgery* 1985; 98: 81-86.
45. Malyar N, Fürstenberg T, Wellmann J, Meyborg M, Lüders F, Gebauer K, Bunzemeier H, Roeder N, Reinecke H. Recent trends in morbidity and in-hospital outcomes of in-patients with peripheral arterial disease: a nationwide population-based analysis. *Eur Heart J* 2013; 34: 2706-2714.
46. Menger MD, Hammersen F, Messmer K. Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 38: 139-145.
47. Menger MD, Hammersen F, Messmer K. In vivo assessment of neovascularization and incorporation of vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 40: 19-25.

48. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 103-110. Review.
49. Murphy GJ, Pararajasingam R, Nasim A, Dennis MJ, Sayers RD. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in vascular surgical patients. *Ann R Coll Surg Engl* 2001; 83: 158-163.
50. Mussa FF, Hedayati N, Zhou W, El-Sayed HF, Kougias P, Darouiche RO, Lin PH. Prevention and treatment of aortic graft infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5: 305-315. Review.
51. Nagpal A, Sohail MR. Prosthetic vascular graft infections: a contemporary approach to diagnosis and management. *Curr Infect Dis Rep* 2011; 13: 317-323.
52. O'Brien T, Collin J. Prosthetic vascular graft infection. *Br J Surg* 1992; 79: 1262-1267.
53. Peetsch A, Greulich C, Braun D, Stroetges C, Rehage H, Siebers B, Köller M, Eppe M. Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: Synthesis, characterization, and its toxic effects toward mammalian and prokaryotic cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012; 102: 724-729.
54. Ricco JB, InterGard Silver Study Group. InterGard silver bifurcated graft: Features and results of multicenter clinical study. *J Vasc Surg* 2006; 44: 339-346.
55. Ricco JB, Assadian O. Antimicrobial silver grafts for prevention and treatment of vascular graft infection. *Semin Vasc Surg.* 2011; 24: 234-241.
56. Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD. Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 2006; 27: 5027-5038.
57. Saleem BR, Meerwaldt R, Tielliu IF, Verhoeven EL, van den Dungen JJ, Zeebregts CJ. Conservative treatment of vascular prosthetic graft infection is associated with high mortality. *Am J Surg* 2010; 200: 47-52.
58. Saravanapavan P, Gough JE, Jones JR, Hench LL. Antimicrobial Macroporous Gel-glasses: Dissolution and Cytotoxicity. *Key Engineering Materials Vols* 2004; 254-256: 1087-1090.
59. Sayers RD, Raptis S, Berce M, Miller JH. Long-term results of femorotibial bypass with vein or polytetrafluorethylene. *Br J Surg* 1998; 85: 934-938.
60. Silva EA, Mooney DJ. Synthetic extracellular matrices for tissue engineering and regeneration. *Curr Top Dev Biol* 2004; 64: 181-205.

61. Schierholz JM, Lucas LJ, Rump A, Pulverer G. Efficacy of collagen silver-coated medical devices. *J Hosp Infect* 1998; 40: 257-262. Review.
62. Schneider F, O'Connor S, Becquemin JP. Efficacy of collagen silver-coated polyester and rifmapin-soaked vascular grafts to resist infection from MRSA and Escherichia coli in a dog model. *Ann Vasc Surg* 2008; 22: 815-821.
63. Sethi S, Herrmann M, Roller J, von Müller L, Peerschke EI, Ghebrehiwet B, Bajric I; Menger MD, Laschke MW. Blockade of gC1qR/p33, a receptor for C1q, inhibits adherence of Staphylococcus aureus to the microvascular endothelium. *Microvasc Res* 2011; 82: 66-72.
64. Smith SM, Soubhi H, Fortin M, Hudon C, O'Dowd T. Managing patients with multimorbidity: systematic review of interventions in primary care and community settings. *BMJ* 2012; 345: e5205.
65. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-138.
66. Stobie N, Duffy B, McCormack DE, Colreavy J, Hidalgo M, McHale P, Hinder SJ. Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials* 2008; 29: 963-969.
67. Stone PA, Back MR, Armstrong PA, Brumberg RS, Flaherty SK, Johnson BL, Shames ML, Bandyk DF. Evolving microbiology and treatment of extracavitary prosthetic graft infections. *Vasc Endovascular Surg* 2008; 42: 537-544.
68. Swain TW 3rd, Calligaro KD, Dougherty MD. Management of infected aortic prosthetic grafts. *Vasc Endovasc Surg* 2004; 38: 75-82.
69. Szilagyi DE, Smith RF, Elliott JP, Vrandecic MP. Infection in Arterial Reconstruction with Synthetic Grafts. *Ann Surg* 1972; 176: 321-333.
70. The Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. Critical limb ischaemia: management and outcome. Report of a national survey. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; 10: 108-113.
71. Ueberrueck T, Zippel R, Tautenhahn J, Gastinger I, Lippert H, Wahlers T. Vascular graft infections: in vitro and in vivo investigations of a new vascular graft with long-term protection. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74: 601-607.
72. Vogt PR. Arterial allografts in treating aortic graft infection: Something old, something new. *Semin Vasc Surg* 2011; 24: 227-233.

-
73. Von Eiff C, Arciola CR, Montanaro L, Becker K, Campoccia D. Emerging Staphylococcus species as new pathogens in implant infections. *Int J Artif Organs* 2006; 29: 360-367. Review.
74. Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD. Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 1999; 126: 881-889.
75. Wijnhoven S, Peijnenburg W, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens E, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, van de Meent D, Dekkers S, de Jong WH, van Zijverden M, Sips AJ, Geertsma RE. Nano-silver- a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 2009; 3: 109-138.
76. Williams RL, Williams DF. Albumin adsorption on metal surfaces. *Biomaterials* 1988; 9: 206-212.
77. Wu MH, Shi Q, Onuki Y, Kouchi Y, Sauvage LR. Histologic observation of continuity of transmural microvessels between the perigraft vessels and flow surface microostia in a porous vascular prosthesis. *Ann Vasc Surg* 1996; 10: 11-15.
78. Zegelman M, Guenther G, Florek HJ, Orend KH, Zuehlke H, Liewald F, Storck M. Results from the first in man german pilot study of the silver graft, a vascular graft impregnated with metallic silver. *Vascular* 2009; 17: 190-196.

7. Danksagung/ Publikationen

7.1. Danksagung

An dieser Stelle würde ich gerne die Gelegenheit nutzen um bestimmten Menschen zu danken, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Allen voran möchte ich besonders meinem Doktorvater, PD Dr. med. M.R. Moussavian, danken. Zum einen danke ich ihm für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und zum anderen dafür, dass er mich zu jedem Zeitpunkt mit großem Engagement und fachlicher Kompetenz gefördert, beraten und unterstützt hat. Sein Fleiß und seine Einstellung zum Arztberuf werden mir immer Vorbild sein.

Meinem Betreuer, Dr. med. P. Jeanmonod, gilt ebenfalls ein besonderer Dank für die Anleitung in die Arbeitstechniken der Mikroskopie und mikrochirurgischen Präparation der Rückenhautkammer sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Die gemeinsame Arbeit an diesem Projekt wird mir stets in sehr guter Erinnerung bleiben. Ich danke ihm für seine kompetente und freundschaftliche Betreuung.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. M.D. Menger für die Möglichkeit im Institut für Experimentelle Chirurgie die Experimente durchführen zu dürfen. Den Mitarbeitern des Instituts, Janine Becker, Sandra Schuler und Elisabeth Gluding, gebührt ebenfalls Dank. Durch ihre Unterstützung bei Labortätigkeiten und der Erstellung der histologischen Präparate leisteten sie einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium erst ermöglicht haben und mir stets zur Seite standen.

7.2. Publikationen

Originalarbeiten

Jeanmonod P, Laschke MW, Gola N, von Heesen M, Glanemann M, Dold S, Menger MD, Moussavian MR. Silver acetate coating promotes early vascularization of Dacron vascular grafts without inducing host tissue inflammation. *J Vasc Surg* 2013; 58: 1637-1643.

Jeanmonod P, Laschke MW, Gola N, von Heesen M, Glanemann M, Menger MD, Moussavian MR. Early host tissue response to different types of vascular prostheses coated with silver acetate or vaporized metallic silver. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2014, 47: 660-668.